



Joana Duarte Baptista **Inativação fotodinâmica de endósporos**
Couceiro **bacterianos: aplicação de alta pressão como**
coadjuvante na ligação do fotossensibilizador

Photodynamic inactivation of bacterial
endospores: high pressure processing as an
assistant in the photosensitizer binding



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2014

Joana Duarte Baptista **Inativação fotodinâmica de endósporos**
Couceiro **bacterianos: aplicação de alta pressão como**
coadjuvante na ligação do fotossensibilizador

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, Ramo Industrial e Ambiental, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, da Doutora Maria do Amparo Ferreira Faustino, Professora Auxiliar do Departamento de Química e do Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva, Investigador do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Aos meus pais, Manuel e Isabel.

o júri

Presidente

Professora Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier

Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Eliana Sousa Cruz Ferreira Alves

Investigadora em Post-Doc do Departamento de Química da Universidade de Aveiro (arguente)

Professora Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro (orientadora)

agradecimentos

À Professora Doutora Maria Ângela Cunha, pela orientação, disponibilidade total e confiança depositada, essencial à concretização do trabalho.

À Professora Doutora Maria do Amparo Faustino, pela coorientação, pela simpatia e sugestões, e pela ajuda na utilização do espectrofotômetro de fluorescência.

Ao Professor Doutor Jorge Saraiva, pela coorientação, pelas sugestões e conhecimentos transmitidos sobre a tecnologia de alta pressão.

À Professora Doutora Maria Adelaide Almeida, pelo apoio e sugestões pertinentes à realização do trabalho.

À Clara, à Marina, à Deisy e ao Rui pela ajuda, disponibilidade e simpatia, sempre demonstradas.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Aplicada, pelo apoio e simpatia.

Aos meus pais e irmão, que me apoiaram incondicionalmente em todo o percurso.

Ao Frederico, pelo amor, compreensão e força, demonstrados diariamente.

Aos meus amigos, em especial à Ana, à Marli e à Patrícia, que partilharam de todos os momentos bons e menos bons, sempre com um sorriso.

Ao CESAM (projeto PEst-C/MAR/LA0017/2013) e QOPNA (PEst-C/MAR/LA0017/2013), pelo suporte financeiro à realização deste trabalho.

palavras-chave

Endósporos; inativação fotodinâmica; fotossensibilizador; alta pressão; *Bacillus cereus*.

resumo

Os endósporos bacterianos representam riscos significativos em muitas atividades humanas, pelo que é fundamental descobrir formas de inativar estas estruturas. A terapia fotodinâmica (PDT) têm-se revelado uma alternativa promissora para inativar microrganismos patogénicos.

Com este trabalho pretendeu-se avaliar o efeito da alta pressão como coadjuvante do efeito fotodinâmico, na inativação de endósporos de *Bacillus cereus*, usados como modelo biológico de endósporos bacterianos.

Endósporos de *B. cereus* foram preparados em meios de esporulação e conservados a -20 °C até à realização dos ensaios. Como fotossensibilizador (PS), utilizou-se uma porfirina tetracatiónica (Tetra-Py⁺-Me), aplicada nas concentrações de 5 e 20 µM. Os endósporos foram incubados durante 30 min a 37 °C no escuro, na presença de PS, para permitir a adsorção do PS ao material do endósporo. A potência da luz branca usada na irradiação foi 1690 W.m⁻².

O efeito dos vários tratamentos foi avaliado por comparação dos resultados com os valores iniciais da concentração de endósporos viáveis na suspensão não tratada. As variáveis em estudo foram a concentração de PS, a pressão aplicada, a temperatura de incubação e o tempo de exposição à luz branca. Em cada experiência foram incluídos os seguintes controlos: controlo claro (exposto à luz sem PS), controlo escuro (com PS mas não irradiado), controlo de pressão (pressurizado sem PS e não irradiado) e controlo escuro pressurizado (exposição ao PS a 300 MPa, sem exposição à luz). A concentração de endósporos viáveis antes e depois de cada tratamento foi determinada por contagem de colónias após sementeira em meio sólido.

O tempo de congelação do *stock* de endósporos afetou a adsorção de PS. Alíquotas com períodos de armazenamento a -20 °C, entre 15 e 43 dias, produziram valores de adsorção de PS entre 3,63×10⁵ e 8,01×10⁵ moléculas de PS.UFC⁻¹, quando expostas a 5 µM de PS. O aumento da temperatura de pré-incubação no escuro de 37 para 50 °C, resultou no aumento da quantidade de PS adsorvido de 13,1×10⁵ para 26,3×10⁵ moléculas de PS.UFC⁻¹, na presença de 5 µM de PS. A aplicação de pressão (300 MPa, durante 30 minutos) resultou num aumento de 30 a 90% na quantidade de PS ligado aos endósporos nas experiências realizadas com 5 µM de PS. Com 20 µM de PS, os valores de adsorção com pressurização foram 2,3 a 76,1 vezes superiores aos obtidos com pré-exposição ao PS à pressão atmosférica. Os fatores de inativação máximos foram registados para o tratamento correspondente à aplicação de pressão durante o período adsorção do PS, e variou entre 1,1 e 2,4 log.

Embora os fatores de inativação obtidos sejam ainda modestos, os resultados demonstram que a aplicação de alta pressão melhora a ligação do PS aos endósporos e pode funcionar como um fator coadjuvante da inativação fotodinâmica de endósporos bacterianos.

keywords

Endospores; photodynamic inactivation; photosensitizer; high pressure; *Bacillus cereus*.

abstract

Bacterial endospores represent significant risks in many human activities, therefore it is essential to find ways to inactivate these structures. Photodynamic therapy (PDT) have proven to be a promising alternative to inactivate pathogenic microorganisms.

The aim of this work was to evaluate the effect of high pressure as an adjunct to photodynamic effect in the inactivation of *Bacillus cereus* endospores, used as biological models of bacterial endospores.

Endospores of *B. cereus* were prepared in sporulation culture media, and stock suspensions were preserved at -20°C .

A tetracationic porphyrin (Tetra-Py⁺-Me) applied at concentrations 5 and 20 μM was used as photosensitizer (PS). Endospores were incubated in the dark for 30 min at 37°C , in the presence of PS to allow the adsorption of the PS to the endospore material. For the assessment of the photodynamic inactivation, samples were irradiated with white light of 1690 W.m^{-2} of intensity.

The effect of the different treatments was assessed by comparing the results with the initial concentration of viable endospores in the untreated endospore suspension. The variables assessed in this study were PS concentration, applied pressure, incubation temperature and white light exposure time. Each experiment included the following controls: light controls (exposed to light without PS), dark controls (with PS but not irradiated), pressurized controls (pressure without exposure to light or PS) and pressurized dark controls (PS exposure at 300 MPa, without irradiation). The concentration of viable endospores before and after each treatment was determined by colony counting after pour-plating in solid medium.

The storing time of the endospore stock affected the uptake of PS. Aliquots with periods of storage at -20°C between 15 and 43 days produced PS adsorption values between 3.63×10^5 and 8.01×10^5 PS molecules.UFC⁻¹, when exposed to 5 μM of PS. An increase in the pre-incubation temperature, from 37 to 50°C , improved the adsorption of PS, which increased from 13.1×10^5 to 26.3×10^5 PS molecules.UFC⁻¹, in the presence of 5 μM of PS. Pressurized samples (300 MPa for 30 minutes in the presence of PS) showed values of PS adsorption 30 to 90% higher than the controls, in which the dark exposure to 5 μM of PS was conducted at atmospheric pressure. With 20 μM of PS, pressured treatments revealed 2.3 to 76.1-fold increases in PS binding.

The maximum inactivation factors were observed in the treatment corresponding to photodynamic inactivation after high pressure processing during PS adsorption and ranged between 1.1 and 2.4 log.

Although the obtained inactivation factors are still modest, the results show that the application of high pressure improves

the binding of PS to endospores and can function as a co-factor in photodynamic inactivation of bacterial endospores.

Índice

Lista de figuras	III
Lista de tabelas	V
Lista de acrónimos e abreviaturas	VII
1. Introdução	1
1.1. Endósporos como formas de resistência	1
1.2. Processo de esporulação	3
1.3. Endósporos e seu impacto nas atividades humanas	4
1.4. Género <i>Bacillus</i>	6
1.4.1. Classificação morfológica de endósporos de <i>Bacillus</i>	7
1.4.1.1. <i>Bacillus anthracis</i> , o agente etiológico do carbúnculo	7
1.4.1.2. <i>Bacillus cereus</i> como modelo biológico	9
1.5. Inativação de endósporos	10
1.5.1. Métodos clássicos	10
1.5.2. Inativação por alta pressão	12
1.5.2.1. Efeito da alta pressão em endósporos	13
1.5.2.2. Efeito do processamento por alta pressão (HPP) na membrana do endósporo	15
1.5.3. Inativação fotodinâmica	16
1.5.3.1. Moléculas fotossensibilizadoras	17
1.5.3.2. Efeito fotodinâmico antimicrobiano	19
1.5.3.3. Inativação fotodinâmica de endósporos	20
2. Objetivos	23
3. Materiais e Métodos	25
3.1. Preparação do material biológico	25
3.1.1. Avaliação do grau de esporulação	26
3.1.2. Recolha e purificação dos endósporos	26
3.1.3. Controlo da qualidade do material biológico	28
3.2. Fotossensibilizador	28
3.3. Ensaio de adsorção	28
3.4. Ensaio de inativação fotodinâmica	30

3.5. Ensaio de toxicidade da solução de PS	33
3.6. Análise estatística	35
4. Resultados e Discussão	37
4.1. Qualidade do material biológico.....	37
4.2. Adsorção da porfirina tetracatiónica Tetra-Py ⁺ -Me aos endósporos de <i>B. cereus</i>	38
4.2.1. Efeito do tempo de congelação dos <i>stocks</i> de endósporos	40
4.2.2. Efeito da qualidade do material biológico	43
4.2.3. Efeito da temperatura de incubação	44
4.2.4. Efeito da aplicação de alta pressão	45
4.3. Efeito da exposição a alta pressão na eficiência de inativação fotodinâmica 46	
4.4. Efeito da pressão na citotoxicidade do fotossensibilizador	49
5. Conclusões	51
6. Referências	53

Lista de figuras

Figura 1: Estrutura do endósporo bacteriano (o diagrama não está feito à escala). O exospório não está presente em endósporos de todas as espécies. Adaptado de Setlow, 2007 (6).	2
Figura 2: Ciclo de formação do endósporo. Adaptado de Errington, 2003 (14).	4
Figura 3: Mecanismo de ação das toxinas produzidas por <i>B. anthracis</i> no macrófago. O processo inicia-se com a ligação do PA ao recetor da toxina antraz (ATR). De seguida, a protease furina hidrolisa o dímero, resultando apenas uma subunidade de PA ligada ao recetor. Esta subunidade é ligada a mais 6 subunidades, formando-se um heptamero. A este heptamero vai ligar-se EF ou LF. Depois desta ligação, o complexo é endocitado. Através de um poro criado no endossoma, liberta-se o fator de virulência ligado: EF ou LF. No caso de se libertar EF, forma-se um edema, que evita que os macrófagos ataquem corpos estranhos; no caso de se libertar LF, inicia-se uma cascata de passos metabólicos que levam a vias sinalizadoras alteradas e apoptose (39, 40). Adaptado de Prince, 2013 (40).	8
Figura 4: Diagrama representativo de interação com fotossensibilizadores do tipo I e tipo II. Adaptado de Karioti, 2010 (72).	16
Figura 5: Estrutura de um núcleo de fenotiazina [adaptado de Korth, 2001 (77)].	18
Figura 6: (a) Estrutura de um núcleo porfirínico [adaptado de Huang , 2000 (79)]. (b) Estrutura de um núcleo de ftalocianina [adaptado de Minnock, 2000 (80)].	18
Figura 7: Representação esquemática do procedimento usado nos ensaios de inativação fotodinâmica de endósporos de <i>B. cereus</i> . CC – controlo claro; CE – controlo escuro; CP – controlo da pressão aplicada; CEHP – controlo escuro pressurizado; IF – inativação fotodinâmica; IFHP – inativação fotodinâmica com pressão aplicada.	32
Figura 8: Representação esquemática do procedimento usado no ensaio de toxicidade com a solução de PS.	34
Figura 9: Representação esquemática do procedimento usado no ensaio de toxicidade com DMSO.	35

- Figura 10:** Pormenor de uma fotografia tirada ao microscópio, com ampliação de 1000x, em objetiva de imersão, de material recolhido de uma cultura de esporulação de *B. cereus* em meio sólido, preparada pelo método de coloração de Wirtz-Conklin, ao 2º dia de incubação.38
- Figura 11:** Pormenor de uma fotografia tirada ao microscópio, com ampliação de 1000x, em objetiva de imersão, do *stock* de endósporos obtido a partir de culturas de esporulação de *B. cereus* em meio sólido, com 5 dias, após coloração de Wirtz-Conklin.38
- Figura 12:** Gráfico representativo da correlação entre o valor médio de *uptake* obtido à pressão atmosférica e o tempo de armazenamento das suspensões-*stock*, a -20 °C.42
- Figura 13:** Valores médios de *uptake* de PS com diferentes temperaturas de pré-incubação no escuro: os *stocks* A e B foram pré-incubados à temperatura de 37 °C, e o *stock* C foi pré-incubado a 50 °C. As barras de erro representam o desvio padrão calculado para um conjunto de 5 réplicas.45
- Figura 14:** Representação gráfica dos valores médios de fatores de inativação obtidos nos ensaios de PDT. Cálculo baseado na fórmula $FI = \log(N_0/N_f)$, em que N_0 representa a concentração inicial da suspensão diluída com PBS, em UFC.mL⁻¹, e N_f , a concentração da suspensão no final de cada controlo/tratamento. Condições testadas: 1º e 2º ensaios - 5 µM, 5 min; 3º ensaio - 20 µM, 15 min; 4º e 5º ensaios - 20 µM, 60 min.48
- Figura 15:** Representação dos valores médios de fatores de inativação obtidos nos ensaios de citotoxicidade do PS e do solvente (DMSO). Cálculo baseado na fórmula $FI = \log(N_0/N_f)$, em que N_0 representa a concentração de endósporos na suspensão inicial, em UFC.mL⁻¹, e N_f , a concentração de endósporos depois do tratamento de pressão, em UFC.mL⁻¹. Volume de solução de PS e volume de DMSO usado em cada ensaio: 0 µM, 0 µL; 10 µM, 30,7 µL; 20 µM, 62,5 µL; 50 µM, 165 µL.49

Lista de tabelas

Tabela 1: Controlos e tratamentos experimentais dos ensaios de inativação fotodinâmica.....	31
Tabela 2: Valores médios de molécula de PS.UFC ⁻¹ , obtidos nos 4 ensaios de <i>uptake</i> , com porfirina Tetra-Py ⁺ -Me, na concentração de 5 µM, em condições de pressão atmosférica e 300 MPa. Os valores correspondentes a cada ensaio correspondem à média de 3 réplicas do tratamento com alta pressão, e 5 réplicas para o tratamento a pressão atmosférica. PA - pressão atmosférica; HP - 300 MPa.	39
Tabela 3: Valores médios de moléculas de PS.UFC ⁻¹ obtidos nos 3 ensaios de <i>uptake</i> com porfirina Tetra-Py ⁺ -Me, na concentração de 20 µM, em condições de pressão atmosférica e 300 MPa. Os valores correspondentes a cada ensaio correspondem à média de 3 réplicas do tratamento com alta pressão, e 5 réplicas para o tratamento a pressão atmosférica. PA: pressão atmosférica; HP: 300 MPa.	39
Tabela 4: Valores médios de moléculas de PS.UFC ⁻¹ obtidos no ensaio de <i>uptake</i> com porfirina Tetra-Py ⁺ -Me, na concentração de 5 µM, realizado à pressão atmosférica em dois <i>stocks</i> de endósporos sujeitos ao mesmo tempo de congelação a - 20 °C. Os valores correspondentes a cada ensaio correspondem à média e desvio de um conjunto de 5 réplicas.	41

Lista de acrónimos e abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
CC	Controlo claro
CE	Controlo escuro
CEHP	Controlo escuro com pressão
CP	Controlo cultura inicial com pressão
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPA	Ácido dipicolínico
FI	Fator de inativação
GC	Percentagem de Guanina e Citosina na molécula de ADN. (Em “ <i>teor de GC</i> ”.)
h	Horas
HP	Alta pressão (<i>High Pressure</i>)
HPP	Processamento por alta pressão (<i>High-Pressure Processing</i>)
IF	Inativação fotodinâmica
IFHP	Inativação fotodinâmica com alta pressão
log	Unidade logarítmica de base 10
min	Minutos
MPa	Megapascal
N ₀	Teor inicial de endósporos viáveis
N _f	Teor final de endósporos viáveis
PA	Pressão atmosférica
PATS	Esterilização térmica assistida por alta pressão (<i>Pressure-Assisted Thermal Sterilization</i>)
PDT	Terapia fotodinâmica (<i>Photodynamic Therapy</i>)
plyG	Enzima bacteriolítica (Amino-hidrolase de peptidoglicano)
PS	Fotossensibilizador (<i>Photosensitizer</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigénio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SASP	Pequenas proteínas ácido-solúveis (<i>Small Acid-Soluble Spore Proteins</i>)

SODIS	Desinfecção solar (<i>Solar Disinfection</i>)
SPC – DIS	Desinfecção solar e fotocatalítica (<i>Solar and Photocatalytic Disinfection</i>)
Tetra-Py ⁺ -Me	Porfirina tetracatiónica [tetra-iodeto de 5,10,15,20-tetraquis(1-metilpiridínio-4-il)porfirina]
Tri-Py ⁺ -Me-PF	Porfirina tricatiónica [tri-iodeto de 5,10,15- tris (1- metilpiridínio-4-il)-20-(pentafluorofenil)porfirina]
tRNA	RNA (ácido ribonucleico) de transferência
TSA	Tryptic Soy Agar
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
UV	Ultravioleta

1. Introdução

A formação de endósporos é uma estratégia microbiana de dispersão e de sobrevivência, sendo os endósporos encontrados nos mais diversos ambientes onde podem persistir por longos períodos de tempo (1). No entanto, os endósporos bacterianos estão associados a riscos significativos para a saúde humana uma vez que algumas espécies produtoras são patogênicas para o Homem e a esporulação confere-lhes elevada resistência a agentes antimicrobianos químicos e físicos. Assim, a inativação de endósporos através de métodos eficazes, inócuos para o Homem, e ambientalmente sustentáveis, apresenta-se como um desafio atual.

1.1. Endósporos como formas de resistência

Nas bactérias, a esporulação é um mecanismo de resistência, através do qual podem sobreviver a ambientes extremos, por longos períodos de tempo. Denominam-se endósporos porque são formados no interior da célula (2).

Da constituição dos endósporos fazem parte compostos que conferem resistência a agentes químicos, destacando-se o ácido dipicolínico (DPA) e as proteínas SASP (*Small Acid-Soluble Spore Proteins*). A presença do dipicolinato de cálcio pode levar à redução da quantidade de água e indiretamente ao aumento da resistência ao calor pelo endósporo. O dipicolinato de cálcio é libertado durante a germinação. As SASP têm como principal função proteger o material genético, e são destruídas quando se inicia o processo germinativo (3). Os endósporos são assim, difíceis de destruir, e quando produzidos por espécies patogênicas, podem causar graves problemas em locais onde a assepsia e a higiene são cruciais, como é o caso da indústria alimentar e de instalações e equipamentos hospitalares (2, 4, 5).

O endósporo maduro (Figura 1) é tipicamente constituído por várias camadas. O núcleo [1], análogo ao protoplasto na célula vegetativa, contém DNA, ribossomas, tRNA, elevada concentração de ácido dipicolínico e de Ca^{2+} e apenas 25-50% de água (4, 6). A membrana interna [2] constitui uma barreira lipídica,

pouco permeável a pequenas moléculas, e é um fator determinante na resistência a compostos tóxicos (6, 7). A parede da célula germinativa [3] é rica em peptidoglicano idêntico ao encontrado na parede da célula vegetativa (4, 6). O córtex [4], constituído por um tipo particular de peptidoglicano, é essencial na redução do teor de água do endósporo e na manutenção estrutural da membrana interna (4, 6). A membrana externa [5] é formada pela membrana celular da célula-mãe, que envolve o pré-endósporo aquando do processo de “*engulfment*” (8, 9). É constituída por uma bicamada lipídica e proteínas intrínsecas. Contém também a proteína SpoIVA, produzida pela célula-mãe, responsável pela síntese do córtex e orientação para a deposição da capa (10). No entanto, não existem dados que apontem para que esta estrutura tenha um papel importante no estado de latência ou na germinação do endósporo (11). A capa [6], revestimento complexo do endósporo, constituída por diversas camadas contendo diferentes proteínas, é importante para a resistência a stresses químicos, físicos, enzimas líticas e predadores eucariotas (4, 6). O exospório [7], estrutura circundante, constituído por proteínas e hidratos de carbono, não está presente em todas as espécies de *Bacillus* (ocorre em *B. cereus* e *B. anthracis*). Está relacionado com a patogenicidade de endósporos de algumas espécies (4, 6). Na maioria das espécies, o exospório é uma camada que envolve a capa, mas que se separa desta por um hiato denominado inter-espço, cujo conteúdo não é ainda completamente conhecido (12).

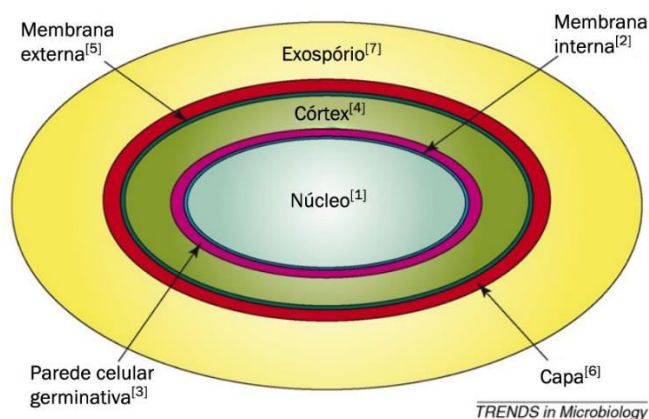


Figura 1: Estrutura do endósporo bacteriano (o diagrama não está feito à escala). O exospório não está presente em endósporos de todas as espécies. Adaptado de Setlow, 2007 (6).

1.2. Processo de esporulação

O processo de esporulação é desencadeado por estímulos ambientais, designadamente falta de água ou escassez de nutrientes (3). O processo envolve uma divisão celular assimétrica que leva à morte da célula original para produzir um único endósporo (Figura 2) (13). A divisão celular tem como principal interveniente a proteína FtsZ, homóloga da tubulina, que polimeriza para formar protofilamentos no local de divisão, numa estrutura conhecida por anel Z. Esta estrutura recruta proteínas associadas à divisão da membrana e assinala o local de início da divisão (14). Após o posicionamento do anel Z e das proteínas, ocorre a síntese da parede e da membrana, e forma-se o septo. Em seguida, ocorre um desenrolamento do anel Z em direção aos polos, e consequente relocalização do septo (14). A fração de menor dimensão, que dará origem ao endósporo, é envolvida pelas membranas septais, e forma-se uma estrutura livre no citoplasma da célula-mãe, o pré-endósporo (14). No interior do pré-endósporo produzem-se proteínas que protegem o DNA de vários tipos de danos, e constituem uma reserva de aminoácidos para a fase de germinação. A célula-mãe produz grandes quantidades de ácido dipicolínico para provocar a desidratação e mineralização do endósporo. O córtex é envolvido por um revestimento proteico de várias camadas (14). Quando o endósporo está maduro, dá-se a lise da célula-mãe, e o endósporo é libertado (3).

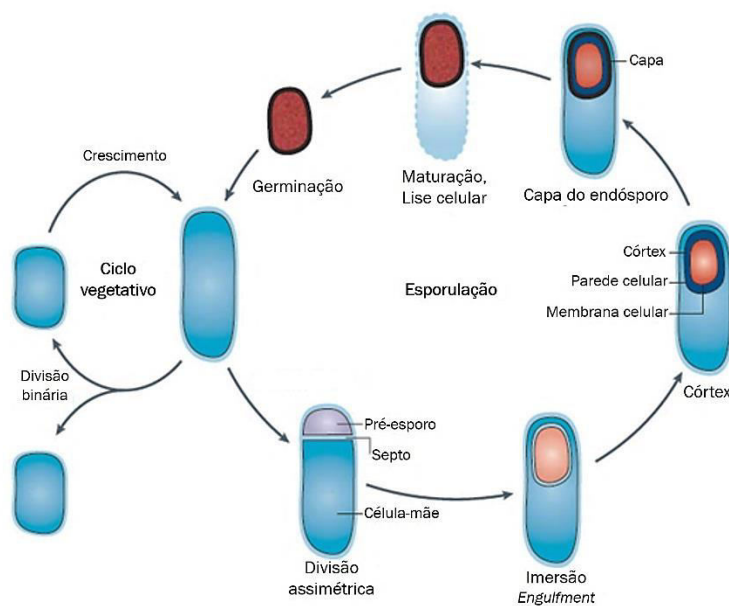


Figura 2: Ciclo de formação do endósporo. Adaptado de Errington, 2003 (14).

O conjunto dos processos envolvidos na esporulação inclui também o desenvolvimento da capacidade de resposta a agentes germinativos específicos, que levam à perda das camadas de proteção, à reidratação e ao crescimento vegetativo (14).

1.3. Endósporos e seu impacto nas atividades humanas

Os endósporos bacterianos são estruturas altamente resistentes, que sobrevivem a condições extremas, nas quais ocorreria inativação das células vegetativas correspondentes. Esta resistência representa um risco biológico acrescido em áreas como a alimentação ou saúde (3).

Bacillus cereus, *Clostridium perfringens* e *C. botulinum* são exemplos de bactérias produtoras de endósporos, veiculadas por alimentos. Pela sua ubiquidade no ambiente e resistência a tratamentos de esterilização, constituem uma preocupação importante em termos de segurança e estabilidade dos alimentos de baixa acidez (5). O próprio endósporo dormente não representa perigo nos alimentos durante o armazenamento. No entanto, a possível germinação do endósporo e consequente desenvolvimento de células vegetativas ativas, pode

causar a deterioração indesejada de alimentos ou intoxicações alimentares graves, principalmente em alimentos mal acondicionados (3, 15).

Os endósporos de *B. cereus* constituem um problema nas indústrias agroalimentares. Resistem a temperaturas elevadas, desidratação, radiação ionizante, enzimas hidrolíticas, valores extremos de pH e antibióticos. Os endósporos de *B. cereus* apresentam filamentos à superfície e são hidrofóbicos, o que lhes permite uma fácil adesão a superfícies de contacto com alimentos, incluindo o aço inoxidável (3, 16).

O botulismo é uma doença que paralisa os tecidos, provocada por neurotoxinas botulínicas (existem 7 tipos). As botulinas são produzidas por bactérias do género *Clostridium*, como *C. botulinum*, *C. baratii*, *C. butyricum* e *C. argentinense* (17). O progresso da doença está associado ao consumo de alimentos contaminados com botulina ou à ingestão de endósporos de bactérias do género *Clostridium*, que germinam no aparelho digestivo, e aí produzem a neurotoxina (18). Em casos mais raros, a doença pode ser também provocada por contacto com a pele ou por inalação dos endósporos (19). Por ser produzida por bactérias anaeróbias, a eliminação do risco de contaminação em alimentos fumados ou preservados em vácuo é muito difícil (20). A prevenção da doença passa pela vacinação com a toxina inativa. No entanto, esta neurotoxina pode ser utilizada para fins terapêuticos e cosméticos, quando administrada de forma controlada. A botulina do tipo A é utilizada para tratar doenças como contração muscular involuntária, espasmos faciais, estrabismo e enxaquecas (21).

O tétano é também uma condição provocada por uma neurotoxina, a tetanospasmina, produzida por *C. tetani* (22). Causa hipomobilidade bocal e rigidez dos músculos esqueléticos, mas pode ser prevenida por vacinação com uma forma inativa da toxina, obtida por adição de formaldeído à forma ativa, e purificação (23). Os endósporos desta espécie encontram-se geralmente no solo, e o hospedeiro é contaminado por contacto com lesões na pele, onde estas estruturas germinam e produzem tetanospasmina (22).

Também no ambiente, os endósporos bacterianos assumem uma crescente importância na qualidade sanitária de meios poluídos. Em ambientes marinhos, persistem mais no tempo do que as células vegetativas, e consequentemente são

transportados por maiores distâncias. São mais resistentes do que as formas vegetativas às alterações ambientais e podem ser detetados até um ano após o fim de descargas poluentes.

Algumas espécies de *Bacillus* produzem endósporos, que podem ainda ser utilizados como potentes armas biológicas, como é o caso de *B. anthracis*, agente infeccioso do carbúnculo.

Estima-se que ocorram, por ano, 20000 a 100000 casos de carbúnculo em todo o mundo (24). Em 2013, foram reportados 14860 casos de tétano à Organização Mundial de Saúde (25). Nos EUA, foram relatados 160 casos de botulismo, em 2012 (26). No período entre 2009 e 2012, foram confirmados 0 casos de carbúnculo, 4 casos de botulismo e 0 casos de tétano em Portugal (27).

Estas situações ilustram a importância dos endósporos enquanto estruturas biológicas de resistência, e tornam óbvia a necessidade do seu controlo e inativação num contexto de segurança microbiológica (3).

1.4. Género *Bacillus*

O género *Bacillus* é um dos mais comuns entre as bactérias produtoras de endósporos, e por isso, muitas vezes usado como modelo biológico em estudos de inativação por agentes químicos ou físicos. As bactérias do género *Bacillus* são Gram-positivas e pertencem ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Bacillales*, família *Bacillaceae* (28). O género *Bacillus* compreende bactérias em forma de bastonete, aeróbias ou anaeróbias facultativas, e formadoras de endósporos, amplamente distribuídas em solos (2, 16). A gama de temperaturas ótimas de crescimento para a maioria das espécies de *Bacillus* situa-se no intervalo de 25 °C a 37 °C, com uma gama de tolerância a pH entre 2 e 10. Existem espécies extremófilas, que podem crescer a temperaturas tão altas como 75 °C (termófilas), ou tão baixas como 3 °C (psicrófilas) (3). Tradicionalmente, são classificadas no grupo das bactérias Gram-positivas, com baixo teor de GC. No entanto, a percentagem de GC varia entre 32% e 69% (4).

As diferentes espécies do género *Bacillus* diferem quanto à fisiologia, nichos ecológicos, características do genoma e regulação da sua expressão. São geralmente isoladas do solo, ar e água, e são também ubíquas em muitos ambientes, pois conseguem utilizar uma vasta gama de compostos orgânicos e inorgânicos no estado vegetativo e usar a forma de endósporo para resistir a condições de stresse (29).

1.4.1. Classificação morfológica de endósporos de *Bacillus*

As espécies do género *Bacillus* dividem-se em três grandes grupos, com base na morfologia e posição do endósporo.

Os membros do grupo I apresentam o endósporo na posição central ou terminal, com forma esférica ou elíptica. Este grupo é ainda subdividido em outros dois subgrupos: um primeiro subgrupo, também designado por grupo *B. cereus*, é composto por bacilos de diâmetro superior a 1 µm que apresentam inclusões de poli-β-hidroxibutirato (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*) (30, 31); um segundo subgrupo é constituído por bacilos com diâmetro inferior a 1 µm e desprovidos de inclusões de poli-β-hidroxibutirato (*B. coagulans*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*) (16, 31, 32).

O grupo II é constituído por espécies Gram variáveis, que apresentam o endósporo em elipse, central ou terminal e cuja formação causa deformação da parede celular (*B. circulans*, *B. stearothermophilus*) (16).

O grupo III é constituído por bacilos Gram variáveis, que apresentam um endósporo esférico terminal (*B. polymyxa*, *B. larvae*) (16).

1.4.1.1. *Bacillus anthracis*, o agente etiológico do carbúnculo

O carbúnculo, por vezes também designado por Antrax, é uma doença com elevada mortalidade entre mamíferos e algumas espécies de aves, e suscita, por

isso, uma preocupação acrescida em termos de saúde. É causado por *B. anthracis*, cujos endósporos podem persistir no ambiente durante décadas (33, 34). O endósporo de *B. anthracis* é considerado uma arma biológica letal, de categoria A, pelo centro de prevenção e controlo de doenças, capaz de causar mortalidade massiva na eventualidade de um ataque bioterrorista (33, 35).

A infeção por *B. anthracis* pode ocorrer por ingestão, contacto através de lesões na pele, ou inalação, sendo esta última a forma mais mortífera de infeção, (33). Após a entrada no hospedeiro, os endósporos de *B. anthracis* são transportados para os nódulos linfáticos, onde germinam. As células vegetativas resultantes produzem toxinas e multiplicam-se rapidamente no sangue (36).

B. anthracis produz duas toxinas. O antígeno protetor (PA) e o fator letal (LF) formam uma toxina letal, que provoca a morte súbita em animais. O fator edema (EF) em conjunto com PA induz edema, um aumento de fluido intersticial na zona inicialmente afetada (37). Os sintomas típicos da doença são dificuldade respiratória, hemorragia e, por fim, a morte (38). Na Figura 3 está representado o mecanismo de ação das toxinas de *B. anthracis*.

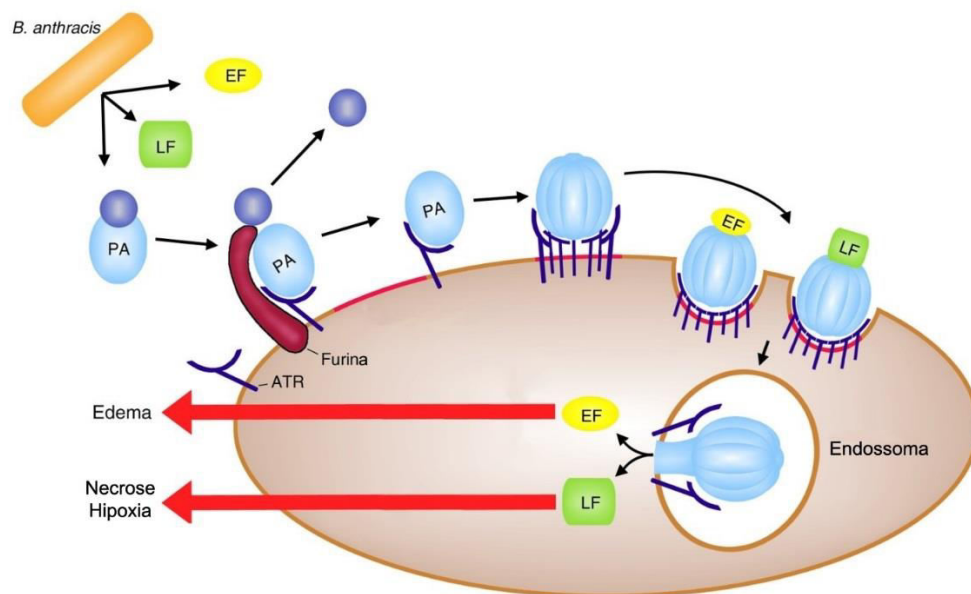


Figura 3: Mecanismo de ação das toxinas produzidas por *B. anthracis* no macrófago. O processo inicia-se com a ligação do PA ao recetor da toxina antraz (ATR). De seguida, a protease furina hidrolisa o dímero, resultando apenas numa subunidade de PA ligada ao recetor. Esta subunidade é ligada a mais 6 subunidades, formando-se um heptamero. A este heptamero vai ligar-se EF ou LF. Depois desta ligação, o complexo é endocitado. Através de

um poro criado no endossoma, liberta-se o fator de virulência ligado: EF ou LF. No caso de se libertar EF, forma-se um edema, que evita que os macrófagos ataquem corpos estranhos; no caso de se libertar LF, inicia-se uma cascata de passos metabólicos que levam a vias sinalizadoras alteradas e apoptose (39, 40). Adaptado de Prince, 2013 (40).

Em 2001, o incidente “Amerithrax”, em que cartas com pó de endósporos de *B. anthracis* foram enviadas para o governo dos EUA, matou cinco pessoas, e afetou mais 17, o que resultou num custo de mais de mil milhões de dólares (33). A maioria dos incidentes que envolvem pós suspeitos revela-se inócua. Ainda assim, este tipo de incidentes tem consequências, pois, não sendo fácil descartar a hipótese de existirem endósporos de *B. anthracis*, os artigos suspeitos são tratados como ameaças reais. Nos EUA, ocorrem por ano cerca de 3000 incidentes com amostras suspeitas (33). É premente a necessidade de técnicas capazes de inativar estes agentes.

Dado o elevado risco para a saúde humana, muitas vezes os estudos de inativação não são feitos em *B. anthracis*, mas sim em modelos biológicos representativos. *B. cereus*, parente filogeneticamente próximo e menos patogénico para humanos (3) é um dos modelos biológicos de *B. anthracis* mais usados.

1.4.1.2. *Bacillus cereus* como modelo biológico

A espécie *B. cereus*, que quando referida isoladamente é designada por *Bacillus cereus sensu stricto*, é frequentemente usada como modelo biológico em estudos relacionados com estratégias de deteção, controlo e inativação da espécie patogénica *B. anthracis* (30, 41). *Bacillus cereus sensu stricto* tem várias propriedades físicas e químicas semelhantes a *B. anthracis*, mas à exceção de algumas estirpes patogénicas, não provoca geralmente graves problemas à saúde (42).

Dados genéticos apontam para que *B. anthracis*, *B. cereus sensu stricto* e *B. thuringiensis* sejam membros de uma única espécie, denominada *B. cereus sensu lato* (30, 43, 44). A estrutura do peptidoglicano de *B. cereus sensu stricto* apresenta características particulares que são também encontradas em *B.*

anthracis (41, 45). *B. cereus sensu stricto* e *B. anthracis* são, no entanto, diferentes quanto à ocorrência e tipo de plasmídeos (46, 47). Em *B. anthracis* estão presentes os plasmídeos pX01 e pX02, ausentes em *B. cereus sensu stricto* (46, 47).

1.5. Inativação de endósporos

1.5.1. Métodos clássicos

A inativação de endósporos bacterianos tem sido considerada como um desafio para a saúde humana, qualidade ambiental e segurança alimentar (2, 48). Existem vários métodos de inativação de endósporos, designadamente os que envolvem o uso de agentes químicos, calor seco e húmido, mistura de agentes germinativos e bacteriolíticos, inativação fotodinâmica e mais recentemente, a alta pressão hidrostática, geralmente combinada com outros fatores físicos, como temperaturas altas (2, 46, 48).

Os endósporos são relativamente resistentes aos agentes antissépticos e desinfetantes comuns, geralmente usados para destruir bactérias em estado vegetativo, como álcoois e fenóis. Os agentes vulgarmente referidos como esporicidas incluem calor húmido superior a 121 °C, formaldeído ou glutaraldeído, soluções fortes de hipoclorito, dióxido de cloro, e radiação ionizante ou UV (2, 48). Agentes químicos, tais como formaldeído, glutaraldeído, soluções fortes de hipoclorito, dióxido de cloro, óxido de etileno, peróxido de hidrogénio, embora eficazes contra endósporos, têm a sua utilização limitada pela toxicidade que apresentam nas células eucarióticas; as quantidades elevadas de água limpa necessárias para a lavagem depois da aplicação, também representam uma desvantagem. A cloração é amplamente utilizada, mas o impacto ambiental do próprio cloro pode ser problemático. Nos últimos anos, os catiões de prata têm sido introduzidos como um desinfetante no tratamento de águas, entre outras aplicações (3, 49). Para espaços interiores e superfícies, contaminados com endósporos de *B. anthracis*, o método de esterilização mais usado é a aplicação de cloro gasoso (50, 51).

Os mecanismos de atuação dos diferentes agentes esporicidas não são ainda completamente conhecidos. Contudo, têm sido formuladas várias hipóteses explicativas, como a destruição do material genético por raios gama, ultravioleta, agentes alquilantes, formaldeído e calor seco (52), ou danos irreversíveis por agentes oxidantes na membrana interna dos endósporos devido a alterações na permeabilidade, que interrompem o processo germinativo (52). A esterilização por autoclavagem (ar húmido a 121 °C) e a esterilização por calor seco (ar seco a 220 °C) também oferecem uma inativação satisfatória. No entanto, não podem ser utilizadas em alguns materiais de revestimento poliméricos, devido à alta temperatura utilizada (49). A autoclavagem é um processo geralmente utilizado para a preservação de alimentos de baixa acidez, que envolve temperaturas acima de 115 °C durante vários minutos, para inativar os microrganismos contaminantes. Embora eficaz, a elevada temperatura não é desejável para a qualidade organolética e nutricional dos alimentos (15).

Em vários estudos de aplicação de radiação UV como processo de desinfecção de águas residuais, constatou-se que os endósporos bacterianos apresentam uma grande resistência, ao contrário das células de estirpes não formadoras de endósporos, sendo por isso necessário intensidades mais elevadas para atingir a mesma taxa de inativação (53). É importante também referir que o uso de radiação UV para a descontaminação está também associado a riscos para a saúde, por poderem danificar a estrutura do DNA e induzir mutagénese (49, 53). A resistência apresentada pelos endósporos de *Bacillus* à irradiação com luz UV deve-se à desidratação do citoplasma e proteção do DNA pelas SASP (46). Devido a esta proteção, que altera a conformação do DNA, o fotoproduto predominante é 5-timinil-5,6-di-hidrotimina (54), para o qual existe um mecanismo de reparação específico eficiente, contribuindo para a resistência aos raios UV (46).

Os endósporos bacterianos revelam também elevada resistência à desinfecção solar (SODIS - Solar Disinfection) e à desinfecção fotocatalítica (SPC-DIS - Solar and Photocatalytic Disinfection) com dióxido de titânio (TiO₂) em reatores, não tendo sido conseguida uma redução dos endósporos de *B. subtilis* superior a 1,7 log (3).

Enquanto a inativação de endósporos é bastante difícil, a inativação de células de bactérias em estado vegetativo é relativamente fácil (46). Assim, uma mistura de um agente de germinação (L-alanina) com uma enzima bacteriolítica (plyG) pode efetivamente inativar os endósporos de *Bacillus* (55). O primeiro provoca a germinação dos endósporos em células vegetativas, que são facilmente inativadas por plyG (55). No entanto, as enzimas apenas podem ter como alvo estirpes específicas (53).

1.5.2. Inativação por alta pressão

A aplicação de alta pressão para a inativação de microrganismos contaminantes e enzimas que catalisam processos de deterioração, mantendo outros atributos de qualidade, tem incentivado a introdução desta tecnologia no processamento de alimentos (56). Além disso, o tratamento de alta pressão pode resultar em produtos alimentares que adquirem uma nova estrutura e textura, e, portanto, pode ser utilizado para desenvolver novos produtos, ou aumentar a funcionalidade de determinados ingredientes (56).

Entre as principais vantagens desta tecnologia estão o processamento de alimentos à temperatura ambiente ou a temperaturas ainda mais baixas, o facto de se atingir a mesma pressão ao mesmo tempo em todo o sistema, independentemente do tamanho e geometria, que torna opcional a redução de tamanho, e a possibilidade de inativar microrganismos sem uso de calor. Observou-se ainda que o efeito da alta pressão sobre os microrganismos é semelhante ao da alta temperatura, sem no entanto, apresentar os mesmos efeitos negativos nas propriedades organoléticas do alimento. Apesar de a esterilização térmica a alta temperatura ser um método eficaz de inativação de endósporos bacterianos, pode não ser aplicável em alimentos cujas propriedades sejam mais sensíveis ao calor. Consequentemente, novas tecnologias de esterilização, como a esterilização térmica assistida por alta pressão (PATS), têm sido testadas para inativar os endósporos bacterianos e ao mesmo tempo, preservar as qualidades dos alimentos (56).

Os endósporos bacterianos são muito resistentes à alta pressão, comparativamente com células vegetativas. Enquanto células vegetativas são inativadas com pressões da ordem de 300 MPa (57), a inativação de endósporos, a temperaturas inferiores a 10 °C, requer pressões superiores a 900 MPa (58). Para criar uma alternativa que proteja a qualidade dos alimentos, desenvolveu-se a esterilização térmica assistida por alta pressão (PATs). O processamento por PATs depende de uma combinação de temperatura moderada e pressão muito elevada (400-900 MPa) (5). Um estudo feito com *B. cereus*, *B. licheniformis* e *B. stearothermophilus* mostrou que a combinação de temperaturas relativamente altas e pressões elevadas é eficiente na inativação dos endósporos destas espécies. Para *B. cereus*, determinou-se que um ciclo duplo de pressurização a 20 °C (a primeira pressurização a 200 MPa por 1 min, e a segunda a 900 MPa por 1 min), em tampão fosfato, é eficaz para inativar completamente uma suspensão de concentração 4×10^5 endósporos.mL⁻¹. Culturas de *B. licheniformis* (concentração inicial de 6×10^6 endósporos.mL⁻¹) e *B. stearothermophilus* (concentração inicial de 4×10^5 endósporos.mL⁻¹), também em tampão fosfato, foram inativadas com ciclos únicos de pressurização a 800 MPa/3 min/60 °C, e 800 MPa/3 min/70 °C, respetivamente (59).

1.5.2.1. Efeito da alta pressão em endósporos

Os endósporos bacterianos são altamente resistentes à pressão (56). A compreensão dos mecanismos de inativação de endósporos por alta pressão é ainda reduzida, sabendo-se que a alta pressão pode mesmo induzir a germinação dos endósporos. O processo de germinação é dividido em duas fases. A fase I é caracterizada pela ativação dos recetores germinativos e libertação de DPA, enquanto a fase II requer a hidrólise do córtex e a absorção de água pelo núcleo. A ação das enzimas que degradam as SASP no núcleo do endósporo, e a produção de ATP apenas começa na fase II (60).

A aplicação de pressão entre 100 e 600 MPa, com temperaturas entre 20 a 40 °C, induz a abertura de canais de libertação de ácido dipicolínico (DPA), a partir

do núcleo de endósporos, o que provoca a germinação dos mesmos (61). Endósporos de *B. subtilis* sem recetores germinativos germinam mais lentamente (ca. 500 vezes) que os endósporos da estirpe selvagem, na presença de nutrientes, e a sua germinação não é induzida por um valor de pressão de 100 MPa. No entanto, a uma pressão de 550 MPa, é induzida a germinação, tanto de endósporos sem recetores germinativos, como endósporos sem uma de duas enzimas líticas, responsáveis pela hidrólise do córtex aquando da germinação. A germinação dos endósporos aos quais faltam as duas enzimas líticas ou com o córtex não hidrolisado não é induzida por 550 MPa de pressão; ainda assim, esta pressurização leva à libertação de ácido dipicolínico (60, 62). Estes resultados sugerem que (i) a uma pressão de 100 MPa, a germinação de endósporos é induzida através da ativação de recetores germinativos (60), e que (ii) a pressurização a 550 MPa abre canais para a libertação de ácido dipicolínico a partir do núcleo de endósporos, o que conduz a etapas posteriores de germinação (60). O tratamento de cenouras inoculadas experimentalmente com endósporos de *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. licheniformis*, com alta pressão e calor (200-800 MPa e 60-80 °C) confirmou que, a valores de pressão entre 600 e 800 MPa e uma temperatura superior a 60 °C, endósporos sem ácido dipicolínico (DPA) são eficientemente inativados (63, 64).

A iniciação do processo germinativo seguida da inativação de endósporos bacterianos germinados, ou a combinação de alta pressão com outros métodos, como o calor moderado, ultrassons, ou radiação gama, pode assegurar a inativação de endósporos de outro modo resistentes à pressão (56). A combinação de pressão com temperatura em estratégias de esterilização térmica assistida por alta pressão (PATS) tem poucos efeitos negativos nas qualidades sensoriais e nutricionais dos alimentos. A PATS pode efetivamente inativar endósporos de *Bacillus* e *Clostridium* em água, soluções tampão, leite, sumos de frutas (52, 59). Com o tratamento a 621 MPa e 98 °C, durante 5 min, conseguiu atingir-se a esterilidade comercial ($<10^1$ UFC.mL⁻¹) para as espécies em estudo (65). No entanto, a temperatura utilizada em PATS é ainda demasiado elevada para o tratamento de frutas frescas e vegetais, que precisam de manter a integridade da sua textura. A fim de reduzir a intensidade de PATS e obter alimentos com elevadas qualidades nutricionais e

sensoriais, podem ser utilizados agentes químicos como coadjuvantes (52). Uma combinação de PATS e nisina, um agente antimicrobiano usado como conservante natural em alimentos, permite reduzir a pressão, temperatura e tempo utilizados para a inativação de endósporos (66). A combinação de pressão e calor moderado é normalmente necessária para inativar eficazmente endósporos de espécies de *Bacillus*, como *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. subtilis* e ainda espécies de *Clostridium*. Por exemplo, a taxa de inativação de endósporos de *B. anthracis* é maior após um tratamento a 280 MPa e 45 °C (redução de 4,4 log) do que depois de um tratamento a 500 MPa e 20 °C (redução 1 log). *C. sporogenes* é resistente a tratamentos de 600 MPa, 30 min, a 20 °C (67). No entanto, combinando calor moderado (60 °C) e pressão (600 MPa, durante 30 min), é possível obter uma redução de 3 log (67).

1.5.2.2. Efeito do processamento por alta pressão (HPP) na membrana do endósporo

Diferentes explicações para a inativação de endósporos sob alta pressão têm sido propostas. No entanto, os diferentes estudos confirmam que um dos primeiros eventos no mecanismo de inativação é a germinação ou, pelo menos, a perda de resistência ao calor sob HP, causada pela libertação de DPA (63). O aumento da temperatura do processo (> 50 °C) e da pressão (> 600 MPa) acelera fortemente a taxa de libertação de DPA em endósporos de *B. subtilis* e de outras espécies (61). Sob condições de processamento mais extremas, a libertação de DPA a partir do núcleo do endósporo não é iniciada pela HP, mas provavelmente pela abertura direta de canais de Ca^{2+} -DPA na membrana interna do endósporo. Além disso, as alterações estruturais irreversíveis na membrana interna do endósporo podem ocorrer em tais condições, pois a permeabilidade da membrana altera-se (15).

1.5.3. Inativação fotodinâmica

O efeito fotodinâmico é já aplicado para fins terapêuticos, por exemplo, para o tratamento de acne (68). A terapia fotodinâmica (PDT) envolve a utilização de luz, na presença de um agente fotossensibilizador (PS) e de oxigênio, para destruir células. O PS no estado excitado, após absorção de luz, interage com oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS), responsáveis pelas lesões celulares letais (69, 70).

Quando o PS absorve luz, passa para um estado excitado singlete ($^1\text{Ps}^*$). Dependendo da estrutura molecular e do ambiente, o PS pode voltar ao estado fundamental, ou então progredir para o estado excitado tripleto ($^3\text{Ps}^*$) (71).

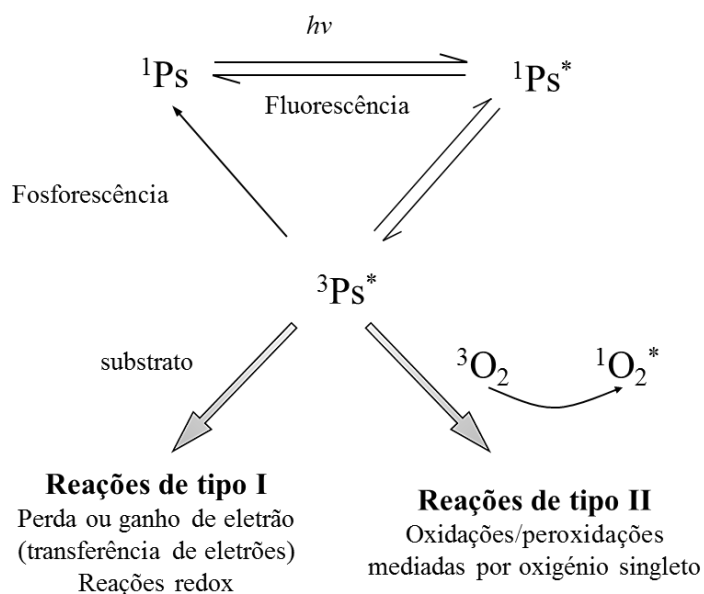
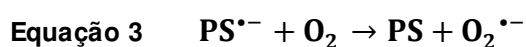


Figura 4: Diagrama representativo de interação com fotossensibilizadores do tipo I e tipo II. Adaptado de Karioti, 2010 (72).

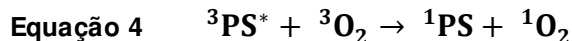
Existem dois mecanismos segundo os quais o PS excitado no estado tripleto pode transferir energia (Figura 4) (71, 73). No mecanismo tipo I, o fotossensibilizador excitado reage diretamente com o substrato. A transferência de um elétron leva à formação de radicais, tanto no substrato, como no PS. Embora a transferência de elétrons possa avançar em qualquer direção (Equação 1 e Equação 2), geralmente o substrato transfere um elétron para o PS (Sub^{++} e Ps^{*-}) (Equação 1).



Na presença de oxigénio, ambos os radicais podem reagir com o oxigénio para produzir produtos oxidados. Este tipo de reação pode resultar na perda do PS. Outra reação possível é a transferência direta do eletrão extra do $\text{PS}^{\bullet-}$ para o oxigénio, e formar-se deste modo o anião radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), regenerando o PS inicial (Equação 3) (71, 73, 74).



Na reação do tipo II, o PS excitado transfere energia para o oxigénio molecular no estado fundamental ($^3\text{O}_2$), produzindo-se oxigénio singlete ($^1\text{O}_2$); regenera-se então o PS original (Equação 4). O oxigénio singlete pode então reagir com o substrato para gerar produtos oxidados (71, 74).



1.5.3.1. Moléculas fotossensibilizadoras

Um grande número de PS tem sido testado para aplicação em terapia fotodinâmica. Quimicamente, os requisitos fundamentais de um bom PS são possuir um alto rendimento de formação de oxigénio singlete, fotoestabilidade, anfifilicidade, seletividade para as células-alvo, solubilidade adequada, não necessariamente em água, e ausência de toxicidade no escuro ou mutagenicidade em concentrações baixas (75).

Os PS mais comuns distribuem-se por várias famílias de compostos heterocíclicos: fenotiazinas (azul de toluidina, azul de metileno), acridinas e macrociclos tetrapirrólicos (porfirinas, ftalocianinas), entre outros (74, 76).

As fenotiazinas, atendendo à sua estrutura e dimensão, intercalam-se nos ácidos nucleicos (74). O mecanismo de ação das acridinas ainda não está totalmente claro, no entanto, pensa-se que atuam como agentes mutagênicos (74).

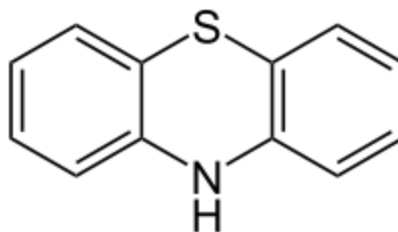
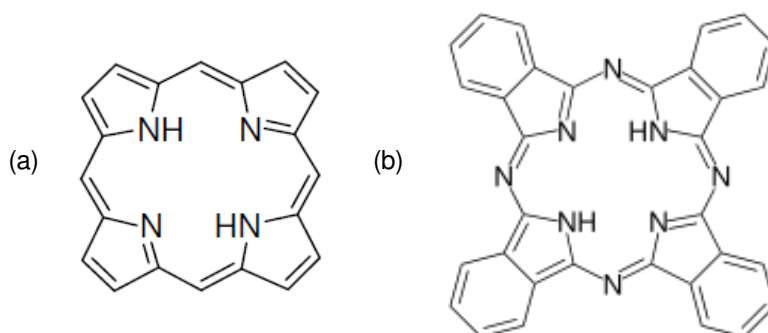


Figura 5: Estrutura de um núcleo de fenotiazina [adaptado de Korth, 2001 (77)].

As porfirinas são macrociclos tetrapirrólicos formados por quatro anéis de tipo pirrólico ligados entre si por pontes metínicas (Figura 6a). Os compostos porfirínicos têm sido amplamente utilizados em tratamentos de PDT e o seu potencial antimicrobiano tem vindo a ser intensamente explorado (78). As porfirinas naturais são importantes em vários processos celulares e, na maioria dos casos, estão complexadas com iões metálicos, formando metaloporfirinas (74).

As ftalocianinas, em vez dos quatro anéis do tipo pirrólico unidos por átomos de carbono metínicos, como as porfirinas, apresentam quatro unidades do tipo isoindole, que estão ligadas por átomos de azoto (Figura 6b). As ftalocianinas apresentam intensa absorção da radiação na região do vermelho e infravermelho, quando comparadas com as porfirinas.



perilenequinonóides são pigmentos naturais obtidos a partir de várias plantas, e que levam ao aparecimento de uma doença de pele (hipericismo) em gado que se alimenta de *Hipericum perforatum* (Erva de São João) (74). Existem também porfirinas de origem natural, com propriedades antibacterianas e antitumorais, como a uroporfirina (82), a protoporfirina (83), e usadas como método de diagnóstico, com a coproporfirina (84).

1.5.3.2. Efeito fotodinâmico antimicrobiano

A inativação fotodinâmica constitui uma alternativa para o controle de microrganismos, que, relativamente aos antibióticos, apresenta a vantagem de envolver uma ação multi-alvo e assim, ser reduzida a probabilidade de desenvolvimento de mecanismos específicos de resistência (53, 85). A terapia fotodinâmica antimicrobiana é designada pela comunidade científica como PACT (Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy) (74). O processo fotodinâmico tem um efeito letal sobre diferentes microrganismos, sendo mais eficiente em vírus e bactérias Gram-positivas, e menos eficiente em bactérias Gram-negativas e fungos.

A estrutura da parede celular parece ser fundamental para determinar a diferença na suscetibilidade à fotossensibilização entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A elevada sensibilidade de bactérias Gram-positivas explica-se pela sua estrutura, uma vez que têm uma camada porosa de peptidoglicano e ácido lipoproteico, que permite a passagem do PS até ao citoplasma. Por outro lado, a membrana externa de bactérias Gram-negativas forma uma barreira física e funcional entre a célula e o meio (69). A natureza das estruturas celulares externas é determinante para a suscetibilidade de diferentes tipos de bactérias à inativação fotodinâmica (85). Os principais alvos da terapia fotodinâmica são a membrana plasmática, a parede celular, e outras estruturas externas ao citosol, não sendo necessária a entrada da molécula fotossensibilizadora no interior da célula. (75, 86, 87).

1.5.3.3. Inativação fotodinâmica de endósporos

Em 2005, demonstrou-se que a inativação fotodinâmica recorrendo a azul de toluidina na concentração de 50 μM e luz vermelha poderia reduzir em 5 a 6 log a concentração de endósporos viáveis (2). Concluiu-se que, apesar da alta resistência a stresse químico e físico, os endósporos de *Bacillus* são suscetíveis à destruição por espécies reativas de oxigénio (ROS). Com uma porfirina tricatiónica, contendo um grupo pentafluorofenilo numa das posições *meso* (Tri-Py⁺-Me-PF), aplicada na concentração 5 μM , foi também possível inativar endósporos de *B. cereus*, tendo sido detetada uma redução de 3,3 log na concentração de endósporos viáveis após 4 min de irradiação com luz branca com uma irradiância de 1690 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$. No entanto, com uma porfirina tetracatiónica (Tetra-Py⁺-Me) aplicada na concentração de 5 μM foi possível observar uma redução máxima de apenas 1,9 log, após 2 min de irradiação com a mesma luz branca, o que demonstra que a eficiência de inativação fotodinâmica de endósporos da mesma espécie, pode variar consideravelmente com a estrutura do fotossensibilizador (3). Entre espécies do mesmo género, também existe variabilidade, quando se trata do mesmo fotossensibilizador. A porfirina tricatiónica Tri-Py⁺-Me-PF causou um decréscimo de mais 3 unidades logarítmicas na concentração de endósporos viáveis de *B. cereus*, mas nas espécies *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. sphaericus*, a inativação nas mesmas condições não ultrapassou 1 log (41).

Alguns endósporos de *Bacillus* e *Clostridium* possuem, eles próprios, porfirinas endógenas, tais como a coproporfirina (48). Assim, utilizando luz azul, de alta intensidade (ca. 400 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$), foi possível causar reduções de 4 log na concentração de endósporos de *Bacillus* e *Clostridium* (48). Com radiação de comprimento de onda 405 nm, e 1,73 $\text{kJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ de energia, foi possível inativar endósporos de *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis* e *C. difficile*. A inativação de bactérias pela luz azul mostrou-se dependente do oxigénio, confirmando que o efeito antimicrobiano está associado à formação de espécies reativas de oxigénio em que derivados porfirínicos endógenos funcionam como PS (50).

Até agora, todos os métodos físicos de destruição de endósporos têm sido relativamente ineficazes, e a aplicação de métodos alternativos, como a inativação fotodinâmica para a destruição de endósporos, testada por Hamblin (2), Oliveira (3) e da Silva (41) tem confirmado que a eficiência de fotossensibilização é fortemente condicionada pela capacidade de ligação do PS ao material do endósporo.

2. Objetivos

A ligação do PS ao material biológico tem sido identificada como um fator determinante na eficiência de inativação fotodinâmica de células bacterianas e endósporos. O objetivo geral deste trabalho foi contribuir para o desenvolvimento de protocolos que assegurem a eficiente inativação fotodinâmica de endósporos bacterianos. Considerando que a exposição a alta pressão induz alterações no revestimento dos endósporos potencialmente suscetíveis de alterar a sua permeabilidade a PS, este trabalho teve como objetivos específicos avaliar se efeito da aplicação de alta pressão como coadjuvante aumenta a ligação de PS aos endósporos e demonstrar se a alta pressão pode ser conceptualmente considerada como um coadjuvante no processo de inativação fotodinâmica de endósporos bacterianos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Preparação do material biológico

Como material biológico utilizou-se uma estirpe de *B. cereus* (ATCC 14579). Para a obtenção de *stocks* de endósporos, revivificou-se uma cultura conservada a -20 °C, em meio Tryptic Soy Broth (TSB, LIOFILCHEM) e incubou-se a 37 °C, com agitação, até se obter uma cultura densa. Esta cultura foi repicada pelo método de riscado por exaustão, para Tryptic Soy Agar (TSA, LIOFILCHEM). Procedeu-se à sua incubação a 37 °C durante 24h e avaliou-se a pureza por observação das características das colónias e observação ao microscópio de preparações frescas. Confirmada a pureza da cultura, selecionou-se uma colónia isolada, a partir da qual se preparou uma nova cultura em TSB, que se incubou a 37 °C, com agitação, durante 24 h.

Para a obtenção de *stocks* de endósporos de *B. cereus* com concentração adequada aos ensaios de inativação, foram testados dois métodos de esporulação reportados na literatura, utilizando alternativamente meio líquido (86) ou meio sólido (88). Para a esporulação em meio líquido foi usado um meio preparado com 16,0 g.L⁻¹ de TSB (Tryptic Soy Broth; LIOFILCHEM), 2,0 g.L⁻¹ de KCl (APPLICHEM) e 0,5 g.L⁻¹ de MgSO₄ (SIGMA). O pH foi ajustado a 7,0 e o meio foi distribuído em frascos de 100 mL e autoclavado a 121 °C, por 20 min. Imediatamente antes da inoculação, adicionou-se a cada frasco de meio de cultura, 100 µL de Ca(NO₃)₂ (SIGMA) 1 M, 100 µL de MnCl₂.4H₂O 0,1 M, 100 µL de FeSO₄ 1 M e 200 µL de solução de D(+)-glucose (SCHARLAU) a 50%. As soluções de suplementos foram esterilizadas por autoclavagem, à exceção da solução de glucose, que foi esterilizada por tinalização. As culturas foram preparadas inoculando cada frasco de 100 mL de meio com 100 µL de cultura fresca. Para a esporulação em meio sólido utilizou-se o meio Nutrient Agar preparado com 3,0 g.L⁻¹ de extrato de carne (MERCK), 5,0 g.L⁻¹ de água peptonada (LIOFILCHEM), 15,0 g.L⁻¹ de agar (LIOFILCHEM) adicionado de 10 mg.L⁻¹ de MnSO₄.H₂O (MERCK). O pH foi ajustado a 7,0. As culturas de esporulação em meio sólido foram preparadas inoculando por riscado as placas de meio de esporulação, a partir de culturas

frescas em TSB ou de colónias isoladas em culturas em TSA. Tanto as culturas líquidas como as culturas sólidas foram incubadas no escuro, durante 3 dias a 37°C. Adicionalmente, na tentativa de aumentar a eficiência de esporulação, algumas culturas líquidas foram incubadas por mais 3 dias a 60 °C e outras foram mantidas a 37 °C durante 2 meses.

3.1.1. Avaliação do grau de esporulação

A presença de endósporos foi evidenciada através de coloração de esfregaços pela técnica de Wirtz-Conklin. Os esfregaços foram preparados misturando, com uma ansa estéril, uma pequena porção de cultura com uma gota de água estéril previamente colocada sobre uma lâmina de vidro. A mistura foi homogeneizada com a ansa e o esfregaço foi fixado à chama. O esfregaço fixado foi coberto com uma solução de verde de malaquite (oxalato de verde de malaquite a 1,5%, ácido acético a 10% e glicerol a 17%, em água destilada) e aquecido à chama durante 5 min sem deixar ferver nem evaporar. Procedeu-se à lavagem com água para remoção do excesso de corante. Sobre o esfregaço, aplicou-se uma solução de safranina (safranina a 0,6% em álcool etílico a 20%) que se deixou atuar durante 1 min. O esfregaço foi novamente lavado com água corrente e seco com papel de filtro. Procedeu-se à observação em microscópio ótico de fundo claro (Laborlux K, LEITZ), em objetiva de imersão, com uma ampliação total de 1000x.

3.1.2. Recolha e purificação dos endósporos

Para recolha dos endósporos, seguiu-se um procedimento adaptado de Demidova (2), para ambos os meios, apenas com diferenças no passo inicial, anterior à inativação das células vegetativas. A cultura em meio líquido foi dividida em alíquotas de 10 mL, aquecida durante 10 min a 100 °C, numa placa de aquecimento (VWR Digital Heat Block), para inativar as células vegetativas, e imediatamente arrefecida em banho de gelo durante 5 min. Das culturas em meio

sólido, raspou-se delicadamente a superfície de cada placa de esporulação com a ajuda de uma ansa descartável estéril e ressuspendeu-se o material em 3 mL de tampão fosfato salino 0,01 M, pH 7,4, sem Ca^{2+} ou Mg^{2+} , (PBS, APPLICHEM). Esta suspensão também foi aquecida durante 10 min a 100 °C, na mesma placa de aquecimento (VWR Digital Heat Block) para inativação das células vegetativas, e imediatamente arrefecida em banho de gelo durante 5 min. A partir desta etapa, o procedimento foi idêntico para ambos os meios de cultura. Procedeu-se à centrifugação (THERMO SCIENTIFIC, Heraeus Pico 17) da suspensão durante 20 min, a 1300 *g e o *pellet* foi submetido a 4 lavagens com uma solução contendo 1 M KCl (APPLICHEM) e 0,5 M NaCl (APPLICHEM), e 1 lavagem com água destilada esterilizada. Finalmente, o sedimento foi ressuspenso numa solução estéril de tampão Tris-HCl (SIGMA), com pH ajustado a 7,2, à qual se adicionou 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de lisozima (SIGMA). A mistura foi incubada *overnight* a 4 °C, para minimizar o risco de germinação. Uma alíquota de 1 mL não foi incubada com lisozima, para posteriormente se calcular o teor residual de células vegetativas presentes no *stock*. A lisozima foi removida por centrifugação a 1300 *g, durante 20 min (THERMO SCIENTIFIC, Heraeus Pico 17) e o *pellet* foi lavado 4 vezes com água destilada estéril. A alíquota sem lisozima foi sujeita ao mesmo procedimento. Após a última lavagem, os endósporos foram ressuspenso em 1 mL de PBS e várias réplicas preparadas foram combinadas num *stock* composto. O *stock* foi homogeneizado e distribuído em alíquotas de 1 mL, que se armazenaram a -20 °C, até à realização das experiências de inativação. Para evitar a germinação, as suspensões de endósporos foram sempre mantidas a -20 °C até cerca de 1 hora antes da sua utilização.

O teor residual de células vegetativas foi estimado por diferença de UFC entre amostras tratadas com lisozima e sem tratamento enzimático.

A pureza do *stock* de endósporos, quanto à presença de células vegetativas, foi verificada por observação ao microscópio ótico de fundo claro de uma amostra da suspensão de endósporos, pelo método de Wirtz-Conklin, tal como descrito na secção 3.1.1.

3.1.3. Controlo da qualidade do material biológico

Antes de cada experiência, preparou-se uma suspensão de endósporos a partir de uma das alíquotas de *stock* congeladas, e determinou-se a concentração inicial de endósporos viáveis. Procedeu-se à diluição decimal em série da suspensão, em soluto de Ringer (MERCK) e semeou-se por incorporação em TSA, em duplicado, alíquotas de 100 μL de cada diluição. Após incubação a 37 °C, durante 48 h, procedeu-se à contagem de colónias e calculou-se o teor de unidades formadoras de colónia por mL de suspensão (UFC.mL^{-1}), a partir da média das contagens das réplicas da melhor diluição, corrigida para o fator de diluição. Este valor foi considerado como o teor inicial de endósporos viáveis nas suspensões usadas nos ensaios de inativação.

3.2. Fotossensibilizador

O PS selecionado para a inativação de endósporos de *B. cereus* foi a porfirina tetra-iodeto de 5,10,15,20-tetraquis(1-metilpiridínio-4-il)porfirina (Tetra-Py⁺-Me, porfirina tetracatiónica), sintetizado pelo grupo de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e já testada com sucesso na inativação de endósporos de *B. cereus* (89). Preparou-se uma solução *stock* 500 μM de Tetra-Py⁺-Me em DMSO, que se armazenou no escuro, até à sua utilização. Imediatamente antes de cada utilização em ensaios de inativação fotodinâmica, a solução de porfirina foi tratada com ultra-sons durante 20 min.

3.3. Ensaios de adsorção

Para determinar a quantidade de PS adsorvido aos endósporos bacterianos (*uptake*) durante o processo de incubação no escuro, ressuspendeu-se 1 mL de *stock* de endósporos em 9 mL de PBS e adicionou-se a porfirina Tetra-Py⁺-Me nas concentrações finais de 5 e 20 μM . O período de pré-incubação no escuro foi de 30 min em todos os ensaios realizados. A temperatura de pré-incubação foi de 37 °C,

à exceção de um ensaio independente, em que foi usada a temperatura de 50 °C, com o qual se pretendeu avaliar a influência da temperatura de pré-incubação no escuro. Da suspensão pré-incubada no escuro, foram retirados 5 mL, que foram sujeitos a pressurização a 300 MPa, durante 30 min, à temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C). Os restantes 5 mL foram mantidos no escuro, durante 30 min, também à temperatura ambiente, mas à pressão atmosférica. Após a pressurização, as suspensões pressurizadas e não pressurizadas foram centrifugadas a 1550 *g, por 6 min, para retirar o PS que não ficou adsorvido aos endósporos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em PBS. Esta suspensão foi, em parte, utilizada para a preparação de diluições decimais e sementeira por incorporação em TSA, em duplicado. As placas de Petri inoculadas foram, então, incubadas por 48 h, no escuro, a 37 °C. A concentração de endósporos foi calculada a partir das contagens de colónias nas réplicas da melhor diluição, corrigida para o fator de diluição e expressa em UFC.mL⁻¹. O volume de suspensão remanescente foi novamente centrifugado para recolha dos endósporos. O *pellet* foi ressuspenso em igual volume de uma solução de digestão, contendo 0,1 M de NaOH e 1% de SDS, em PBS (2). A mistura foi mantida no escuro por um período mínimo de 24 h, até se obter uma solução límpida. Os espectros de fluorescência dos extratos digeridos foram obtidos com um espectrofotómetro de fluorescência (Fluoromax 3 - Horiba Jobin-Yvon) à temperatura de 25 °C, por excitação no comprimento de onda $\lambda = 426$ nm e registo da emissão na região entre 600 a 840 nm, utilizando células de quartzo de 1 mL e percurso ótico de 1 cm. Os dados obtidos foram processados com o auxílio do programa Origin 9.0 (OriginLab) e as áreas sob as curvas de fluorescência calculadas. A concentração de porfirina nos extratos digeridos foi calculada por interpolação com uma reta de calibração, que relaciona a área do sinal com a concentração de fotossensibilizador, construída a partir de padrões de porfirina de concentração conhecida, em solução de digestão.

Depois de determinada a concentração de porfirina nas amostras digeridas, e de estimada a concentração de endósporos nas suspensões, calculou-se a quantidade de material porfirínico adsorvido ao endósporo por UFC, expresso em número de moléculas de PS por unidade formadora de colónia.

Durante todo o ensaio, as suspensões de endósporos foram mantidas, tanto quanto possível, num banho de gelo, para evitar a germinação, e ao abrigo da luz. Foram realizados 4 ensaios independentes para avaliar a influência da alta pressão sobre o *uptake* de fotossensibilizador, a uma concentração de 5 μM , e 3 ensaios, a uma concentração de 20 μM . Em cada ensaio, foram analisadas 3 réplicas de material pressurizado, e 5 réplicas de material não pressurizado. A pré-incubação foi feita no escuro, a 37 °C, durante 30 min, e o ciclo de pressurização teve a duração de 30 min, a 300 MPa, à temperatura ambiente.

Foram também realizados 3 ensaios independentes para avaliar a influência da temperatura de pré-incubação sobre a adsorção de fotossensibilizador, a 5 μM de concentração final, mas também o efeito do tempo de armazenamento a -20 °C sobre o *stock* de endósporos e a sua permeabilidade. Estes 3 ensaios foram realizados em simultâneo; em 2 ensaios, a pré-incubação foi feita no escuro, a 37 °C, durante 30 min, e no terceiro ensaio, a temperatura de pré-incubação escolhida foi 50 °C, realizada também no escuro. Não se efetuou, nestes 3 casos, ciclos de pressão.

3.4. Ensaio de inativação fotodinâmica

O desenho experimental foi dirigido à avaliação do efeito combinado do tratamento com alta pressão, para otimização da ligação do PS, com o efeito fotodinâmico, para a inativação dos endósporos. Assim, foram estabelecidos 4 controlos experimentais e 2 condições de inativação fotodinâmica, com e sem aplicação de alta pressão, de acordo com as combinações apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Controlos e tratamentos experimentais dos ensaios de inativação fotodinâmica.

	PS	Luz	Alta pressão
Controlo claro (CC)	Não	Sim	Não
Controlo escuro (CE)	Sim	Não	Não
Controlo da pressão (CP)	Não	Não	Sim
Controlo escuro pressurizado (CEHP)	Sim	Não	Sim
Inativação fotodinâmica (IF)	Sim	Sim	Não
Pressurização e inativação fotodinâmica (IFHP)	Sim	Sim	Sim

Em cada ensaio de inativação fotodinâmica, foi utilizado 1 mL de suspensão congelada de endósporos, que se ressuspendeu em 9 mL de PBS. Desta suspensão reservou-se duas alíquotas de 2 mL, que posteriormente serviram para a preparação dos controlos claro (CC) e de pressão (CP). À restante suspensão foi adicionada porfirina na concentração final de 5 e 20 μ M, em diferentes ensaios independentes. Esta foi então incubada durante 30 min, a 37 °C, no escuro. Depois da incubação, parte da suspensão, correspondente a CEHP e IFHP, e a alíquota de 2 mL correspondente a CP, foi pressurizada a 300 MPa, por 30 min, à temperatura ambiente. A restante suspensão foi reservada, para ser usada na preparação do controlo escuro (CE) e do tratamento de inativação fotodinâmica sem exposição à pressão (IF). A Figura 7 representa esquematicamente o procedimento usado nos ensaios de inativação fotodinâmica.

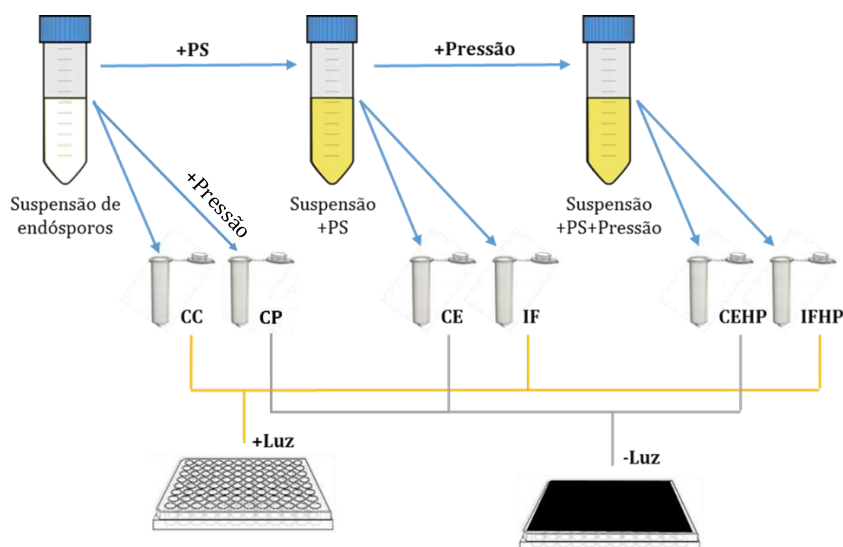


Figura 7: Representação esquemática do procedimento usado nos ensaios de inativação fotodinâmica de endósporos de *B. cereus*. CC – controle claro; CE – controle escuro; CP – controle da pressão aplicada; CEHP – controle escuro pressurizado; IF – inativação fotodinâmica; IFHP – inativação fotodinâmica com pressão aplicada.

No final da pressurização, todas as suspensões anteriormente reservadas (CC, CE, CP, CEHP, IF e IFHP) foram centrifugadas a $1550 \times g$, durante 6 min, para lavagem do PS não adsorvido. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* ressuspenso em igual volume de PBS. Imediatamente antes da irradiação, foi retirada uma alíquota de $50 \mu\text{L}$ de cada controle e tratamento, correspondente às diferentes condições testadas, para efetuar diluições decimais em soluto de Ringer, para a estimativa do teor inicial de endósporos viáveis.

De cada tratamento, transferiu-se 4 alíquotas de $200 \mu\text{L}$ para uma placa de 96 poços. As alíquotas correspondentes aos controles escuros (CE, CEHP e CP) foram colocadas numa outra placa de 96 poços, que foi envolvida em folha de alumínio para proteger da luz. As placas contendo as alíquotas correspondentes aos tratamentos CC, IF e IFHP foram então irradiadas por 5, 15 e 60 min, em ensaios independentes, com luz branca, com uma potência de 1690 W.m^{-2} , fornecida por um sistema de iluminação LC-122 Lumacare.

Após a irradiação, foram retirados $50 \mu\text{L}$ de suspensão de cada poço e procedeu-se à preparação de diluições decimais (uma série de diluições decimais por cada poço) e sementeira para determinação do teor final de endósporos viáveis. As culturas foram incubadas no escuro, a 37°C durante 48 h, e procedeu-se à

contagem de colônias nas réplicas correspondentes às diluições mais adequadas. O teor de endósporos viáveis foi calculado a partir da média das contagens de colônias, corrigida para o fator de diluição, e expresso em UFC.mL⁻¹. O fator de inativação (FI) para cada condição experimental foi calculado pela expressão $FI = \text{Log} (N_0/N_f)$, em que N_0 é o teor inicial de endósporos viáveis, e N_f é o teor final de endósporos em cada condição experimental.

Durante os ensaios de inativação fotodinâmica, as suspensões de endósporos foram mantidas ao abrigo da luz, em banho de gelo fundente, para evitar a germinação. Foram realizados 2 ensaios independentes, para testar a concentração de PS de 5 µM e 5 min de irradiação na inativação fotodinâmica. Para testar 20 µM de PS e 15 min de irradiação, foi efetuado 1 ensaio independente. As condições de 20 µM de PS e 60 min de irradiação foram testadas em 2 ensaios independentes. A pré-incubação foi feita no escuro, a 37 °C, durante 30 min, e o ciclo de pressurização teve a duração de 30 min, a 300 MPa, à temperatura ambiente.

3.5. Ensaio de toxicidade da solução de PS

Para avaliar a hipótese de toxicidade da solução de PS em condições de alta pressão, ressuspendeu-se 1 mL de *stock* de endósporos em 9 mL de PBS, e retirou-se 4 alíquotas de 1,5 mL. A restante suspensão foi mantida num banho de gelo, para posteriormente se proceder à sementeira da cultura inicial sem tratamento. A 3 das alíquotas retiradas, foi adicionada a porfirina Tetra-Py⁺-Me numa concentração final de 10, 20 e 50 µM (30,7; 62,5 e 165 µL de suspensão de PS a 500 µM, respetivamente). A quarta alíquota não foi exposta a PS. A Figura 8 representa esquematicamente o procedimento descrito.

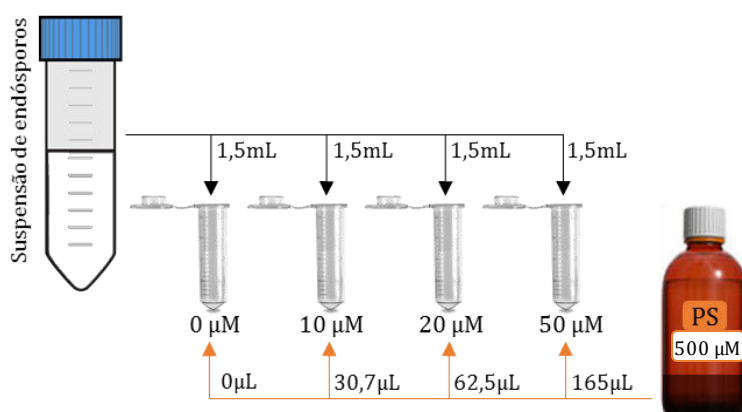


Figura 8: Representação esquemática do procedimento usado no ensaio de toxicidade com a solução de PS.

Todas as alíquotas foram pré-incubadas no escuro durante 30 min, a 37 °C. As alíquotas incubadas foram então pressurizadas a 300 MPa, durante 30 min, à temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C). Após a pressurização, as suspensões pressurizadas foram centrifugadas a 1550 *g, por 6 min, para retirar o PS que não ficou adsorvido aos endósporos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em PBS. Estas suspensões, correspondentes a diferentes concentrações de PS, foram utilizadas para a preparação de diluições decimais e sementeira por incorporação em TSA, em duplicado. As placas de Petri inoculadas foram, então, incubadas por 48 h, no escuro, a 37 °C. A concentração de endósporos foi calculada a partir das contagens de colónias nas réplicas da melhor diluição, corrigida para o fator de diluição, e expressa em UFC.mL⁻¹.

O fator de inativação (FI) para cada condição experimental (concentração de PS) foi calculado pela expressão $FI = \text{Log} (N_0/N_f)$ em que N_0 é o teor inicial de endósporos viáveis, e N_f é o teor final de endósporos em cada condição experimental.

Durante todo o ensaio, as suspensões de endósporos foram mantidas, tanto quanto possível, num banho de gelo, para evitar a germinação, e ao abrigo da luz. Foi realizado 1 ensaio independente, para testar o efeito da solução de PS nas concentrações de 0, 10, 20 e 50 μM de PS, em condições de alta pressão.

Foi também testado o efeito isolado do solvente da solução de PS usada, DMSO. O procedimento usado foi semelhante ao usado para o ensaio com solução

de PS. No entanto, ao invés de ser adicionada solução de PS, foi apenas adicionado DMSO, na mesma razão de volume (30,7; 62,5 e 165 μL). A Figura 9 representa esquematicamente o procedimento descrito.

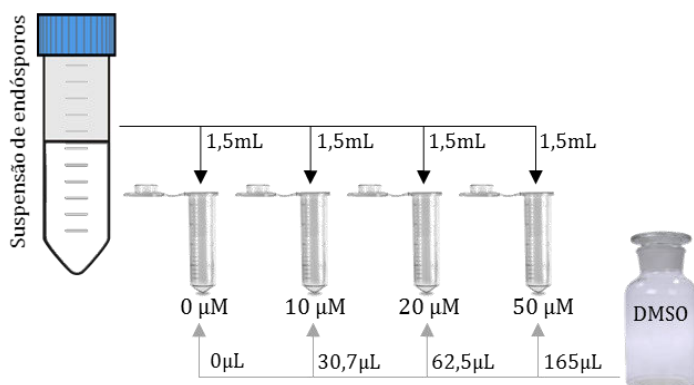


Figura 9: Representação esquemática do procedimento usado no ensaio de toxicidade com DMSO.

Realizou-se 1 ensaio independente, para testar o efeito isolado do volume de DMSO correspondente às concentrações de 0, 10, 20 e 50 μM de PS, em condições de alta pressão.

3.6. Análise estatística

A significância das diferenças entre tratamentos observadas em cada ensaio e a replicabilidade entre os diferentes ensaios foi avaliada recorrendo à ferramenta de análise de dados ANOVA, de fator único, no programa Excel, Microsoft Office. A mesma abordagem foi utilizada para a análise dos resultados obtidos nos ensaios de inativação fotodinâmica. Considerou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas para valores de p inferiores a 0,05.

4. Resultados e Discussão

4.1. Qualidade do material biológico

As culturas de esporulação de *B. cereus* em meio líquido resultaram numa baixa proporção de endósporos, relativamente à concentração de células vegetativas. Após 3 dias de incubação a 37 °C, tal como descrito por Demidova e Hamblin, 2005 (2), a observação ao microscópio após coloração de Wirtz-Conklin, revelou elevada concentração de células vegetativas e baixa concentração de endósporos. Numa tentativa de tornar as condições de cultura mais desfavoráveis e assim induzir a esporulação, testou-se o aumento da temperatura e a extensão do tempo de incubação. Assim, após 3 dias de esporulação a 37 °C, seguidos de 3 dias a 60 °C, foi possível obter *stocks* de endósporos com uma concentração de $1,15 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹, com uma percentagem de células vegetativas de aproximadamente 22%. Esta suspensão foi utilizada em ensaios preliminares de *uptake* de PS. No entanto, o método não se mostrou reprodutível, pois, na repetição do procedimento não foi possível obter endósporos. A temperatura elevada aplicada durante a incubação poderá mesmo ter afetado negativamente a integridade estrutural dos endósporos, fazendo com que não fossem detetados por observação ao microscópio. A tentativa de manter a incubação durante 2 meses, em condições de stresse prolongado, também não resultou no aumento da concentração de endósporos.

As culturas sólidas resultaram numa maior eficiência de esporulação. A evolução do desenvolvimento de endósporos foi feita por colheita periódica de amostras para preparação de colorações e observação ao microscópio durante o período de incubação. Ao fim de 2 dias de incubação, a proporção de endósporos era já elevada relativamente à quantidade de células vegetativas observáveis ao microscópio (Figura 10). O isolamento dos endósporos foi feito após 5 dias de incubação, e permitiu obter um *stock* com uma concentração de $5,47 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹, com um teor vestigial de células vegetativas de 3,1% (Figura 11).



Figura 10: Pormenor de uma fotografia tirada ao microscópio, com ampliação de 1000x, em objetiva de imersão, de material recolhido de uma cultura de esporulação de *B. cereus* em meio sólido, preparada pelo método de coloração de Wirtz-Conklin, ao 2º dia de incubação.

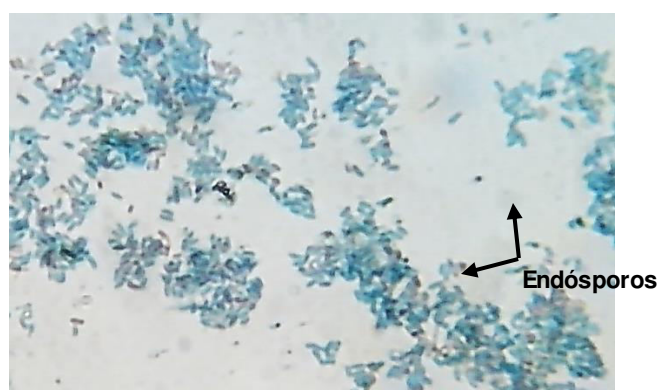


Figura 11: Pormenor de uma fotografia tirada ao microscópio, com ampliação de 1000x, em objetiva de imersão, do *stock* de endósporos obtido a partir de culturas de esporulação de *B. cereus* em meio sólido, com 5 dias, após coloração de Wirtz-Conklin.

4.2. Adsorção da porfirina tetracatiónica Tetra-Py⁺-Me aos endósporos de *B. cereus*

De forma a determinar a influência do tratamento de pressão sobre a adsorção de PS ao endósporo foram realizados 7 ensaios de *uptake*, nos quais se avaliou, quantitativamente, o PS adsorvido ao endósporo em diferentes condições de exposição. Foram testadas as concentrações de 5 e 20 μM de Tetra-Py⁺-Me, aplicadas unicamente à pressão atmosférica ou com exposição à pressão de 300 MPa durante 30 min. Os resultados dos 4 ensaios realizados com a concentração de 5 μM encontram-se resumidos na Tabela 2, e os resultados dos 3 ensaios com

a concentração de 20 μM encontram-se na Tabela 3. De notar que os ensaios de *uptake* de PS na concentração de 5 μM foram realizados com suspensões-*stock* obtidas em meio de esporulação líquido, cuja concentração inicial foi de $1,15 \times 10^7 \text{ UFC.mL}^{-1}$, com uma percentagem de células vegetativas de aproximadamente 22%. Os ensaios com 20 μM de PS foram realizados com as suspensões-*stock* obtidas em meio de esporulação sólido, cuja concentração inicial foi $5,47 \times 10^9 \text{ UFC.mL}^{-1}$, com um teor vestigial de células vegetativas de 3,1%.

Tabela 2: Valores médios de molécula de PS.UFC⁻¹, obtidos nos 4 ensaios de *uptake*, com porfirina Tetra-Py⁺-Me, na concentração de 5 μM , em condições de pressão atmosférica e 300 MPa. Os valores correspondentes a cada ensaio correspondem à média de 3 réplicas do tratamento com alta pressão, e 5 réplicas para o tratamento a pressão atmosférica. PA - pressão atmosférica; HP - 300 MPa.

Ensaio	PA		HP		<i>p</i>
	Média	Desvio	Média	Desvio	
1 (09/06/14)	$3,63 \times 10^5$	$0,983 \times 10^5$	$4,59 \times 10^5$	$1,50 \times 10^5$	$1,80 \times 10^{-1}$
2 (16/06/14)	$4,15 \times 10^5$	$0,241 \times 10^5$	$8,04 \times 10^5$	$1,24 \times 10^5$	$2,07 \times 10^{-4}$
3 (30/06/14)	$4,05 \times 10^5$	$0,270 \times 10^5$	$5,33 \times 10^5$	$0,88 \times 10^5$	$3,29 \times 10^{-4}$
4 (07/07/14)	$8,01 \times 10^5$	$0,969 \times 10^5$	$13,2 \times 10^5$	$2,08 \times 10^5$	$1,78 \times 10^{-4}$

Tabela 3: Valores médios de moléculas de PS.UFC⁻¹ obtidos nos 3 ensaios de *uptake* com porfirina Tetra-Py⁺-Me, na concentração de 20 μM , em condições de pressão atmosférica e 300 MPa. Os valores correspondentes a cada ensaio correspondem à média de 3 réplicas do tratamento com alta pressão, e 5 réplicas para o tratamento a pressão atmosférica. PA: pressão atmosférica; HP: 300 MPa.

Ensaio	PA		HP		<i>p</i>
	Média	Desvio	Média	Desvio	
1 (22/10/14)	$1,92 \times 10^5$	$0,166 \times 10^5$	147×10^5	$4,69 \times 10^5$	$6,65 \times 10^{-11}$
2 (5/11/14)	$1,81 \times 10^5$	$0,141 \times 10^5$	$4,13 \times 10^5$	$0,354 \times 10^5$	$1,15 \times 10^{-6}$
3 (12/11/14)	$1,51 \times 10^5$	$0,119 \times 10^5$	$5,32 \times 10^5$	$0,495 \times 10^5$	$2,68 \times 10^{-6}$

O valor máximo de PS adsorvido aos endósporos na concentração inicial de 5 μM foi de $8,01 \times 10^5$ moléculas de PS.UFC⁻¹ à pressão atmosférica e de $13,2 \times 10^5$ moléculas de PS.UFC⁻¹ com aplicação de 300 MPa, durante 30 min.

Nos ensaios com 20 μM de PS, o valor máximo adsorvido aos endósporos, à pressão atmosférica foi de $1,92 \times 10^5$ moléculas de PS. UFC⁻¹, enquanto o valor máximo de PS adsorvido nas amostras pressurizadas a 300 MPa durante 30 min, foi de 147×10^5 moléculas de PS.UFC⁻¹.

No seu conjunto, os resultados demonstram que a aplicação de pressão aumentou a fixação de PS aos endósporos durante o período de incubação no escuro, sendo este efeito particularmente significativo quando o PS foi aplicado na concentração mais elevada (20 μM). Embora se tenha verificado uma variabilidade considerável entre os diferentes ensaios, quando a análise foi realizada comparando os tratamentos de cada ensaio individualmente, as diferenças entre os valores de *uptake* obtidos, com e sem pressurização, revelaram-se estatisticamente significativas.

4.2.1. Efeito do tempo de congelação dos *stocks* de endósporos

Os valores médios de *uptake* correspondentes aos diferentes ensaios com a concentração de 5 μM (Tabela 2) revelaram-se significativamente diferentes entre si (ANOVA, $p = 0,26$) com tendência para aumento da quantidade de PS fixada ao longo da série de ensaios organizada cronologicamente, à exceção dos resultados do tratamento com pressão do 3º ensaio. Este efeito pode estar relacionado com o tempo de congelação dos *stocks*. De facto, decorreu um período de 28 dias entre o 1º e o 4º ensaio, durante o qual os *stocks* foram conservados a $-20\text{ }^\circ\text{C}$, sem adição de crio-protetor, como é prática no caso de endósporos, de modo a reduzir o risco de germinação durante a conservação ou aquando da descongelação. Durante este período pode ter ocorrido uma alteração da permeabilidade da parede dos endósporos, que terá aumentado a afinidade ou capacidade de retenção de fotossensibilizador. O teor residual em células vegetativas poderá ter também influenciado este aumento de *uptake*, na medida em que estas poderão ter estado também envolvidas numa maior fixação do PS.

Para avaliar o efeito do tempo de congelação das suspensões-*stock* de endósporos sobre a sua capacidade de retenção de PS, procedeu-se a um ensaio adicional de *uptake* à pressão atmosférica, usando dois *stocks* com o mesmo tempo

de congelação (57 dias). Colocou-se como hipótese que, se o *uptake* varia com o tempo de congelação, dois *stocks* com a mesma concentração de endósporos e o mesmo tempo de congelação (*stocks* A e B) apresentariam o mesmo valor de *uptake*. A adsorção de PS pelos endósporos dos *stocks* A e B (Tabela 4) não foi significativamente diferente (ANOVA, $p=0,30$), o que corrobora a hipótese de que o fator tempo pode estar subjacente às diferenças de *uptake* entre diferentes ensaios.

Tabela 4: Valores médios de moléculas de PS.UFC⁻¹ obtidos no ensaio de *uptake* com porfirina Tetra-Py⁺-Me, na concentração de 5 µM, realizado à pressão atmosférica em dois *stocks* de endósporos sujeitos ao mesmo tempo de congelação a - 20 °C. Os valores correspondentes a cada ensaio correspondem à média e desvio de um conjunto de 5 réplicas.

	Pressão atmosférica		
	Média	Desvio	<i>p</i>
<i>Stock</i> A	13,1×10 ⁵	2,18×10 ⁵	0,30
<i>Stock</i> B	11,6×10 ⁵	1,95×10 ⁵	

A análise da correlação entre o valor médio de *uptake* obtido à pressão atmosférica e o tempo de congelação dos *stocks* confirma uma correlação positiva significativa ($R^2 = 0,821$; $n = 5$) (Figura 12).

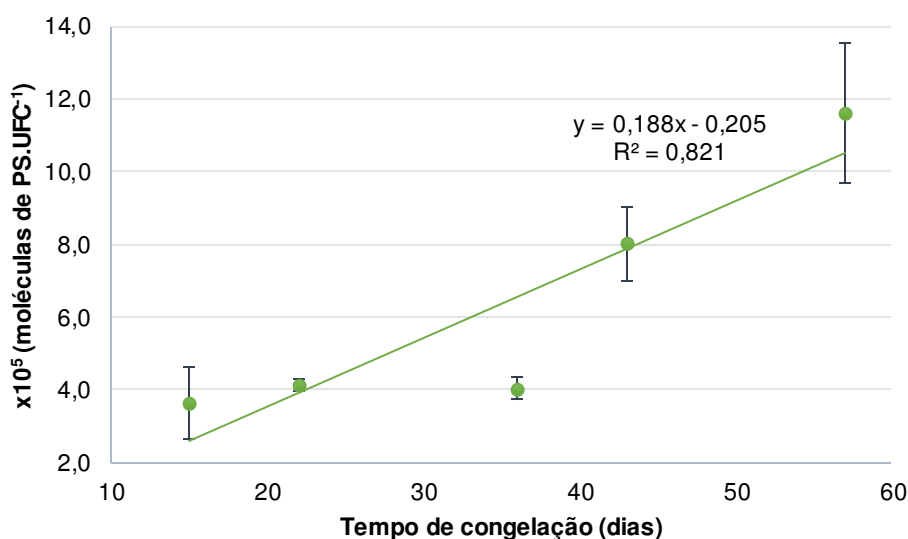


Figura 12: Gráfico representativo da correlação entre o valor médio de *uptake* obtido à pressão atmosférica e o tempo de armazenamento das suspensões-stock, a -20 °C.

A tendência para aumento de *uptake* com o aumento do tempo de congelamento não se verificou nos ensaios com 20 μ M de PS. Uma possível explicação será a qualidade do material biológico usado nas séries de ensaios a 5 μ M e a 20 μ M. Como já foi referido anteriormente, a concentração inicial de endósporos no *stock* utilizado nos ensaios de adsorção com 5 μ M de PS foi $1,15 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹, com aproximadamente 22% de células vegetativas. Nos ensaios a 20 μ M, a concentração de endósporos foi superior ($5,47 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹) e com menor proporção de células vegetativas (3,1%). Esta concentração, 100 vezes superior à do primeiro *stock*, constituiu uma diferença importante em termos de condições experimentais, uma vez que faz variar significativamente o rácio entre a quantidade de moléculas de PS e a quantidade de endósporos. Este rácio foi superior nos ensaios a 5 μ M e pode ter permitido que se evidenciassem as diferenças de permeabilidade associadas ao tempo de congelamento.

Nos ensaios de *uptake* com 20 μ M, verificou-se uma anomalia nos resultados obtidos no dia 22 de Outubro. De facto, neste ensaio, o número de UFC registado para o tratamento com pressão foi anormalmente inferior ao registado para o tratamento à pressão atmosférica, aumentando assim o quociente molécula de PS/UFC. Este efeito foi considerado fortuito e não relacionado com o tempo de armazenamento dos *stocks* de endósporos. Os resultados dos 3 ensaios

independentes de *uptake* à concentração de 20 μM , à pressão atmosférica, não são significativamente diferentes (ANOVA, $p > 0,356$). Este facto é indicador de que, para a suspensão-*stock* usada nos ensaios a 20 μM , a janela temporal de 22 dias correspondente ao armazenamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ não afetou significativamente a adsorção do PS.

4.2.2. Efeito da qualidade do material biológico

A utilização de duas suspensões-*stock* de endósporos com qualidade diferente (concentração de endósporos e proporção de células vegetativas) poderá ter afetado a reprodutibilidade dos ensaios independentes realizados. De facto, o *uptake* máximo de PS à pressão atmosférica nos ensaios com 20 μM de PS ($1,92 \times 10^5$ moléculas de PS.UFC⁻¹) foi inferior ao menor valor de adsorção registado nos ensaios com 5 μM de PS ($3,63 \times 10^5$ moléculas de PS.UFC⁻¹) (Tabelas 2 e 3), o que aponta para uma relação inversa entre *uptake* e concentração de endósporos, com a mesma concentração de PS.

Trabalhos anteriores com suspensões de endósporos de *B. cereus* com uma concentração média de 10^8 UFC.mL⁻¹, realizados à pressão atmosférica, resultaram em valores de *uptake* superiores (89). Porém, nos referidos ensaios a pré-exposição ao fotossensibilizador decorreu durante 3 h, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (89).

A relação entre a concentração de células e a fixação de PS tem sido observada em diferentes microrganismos. Estudos feitos com *Escherichia coli* (bactéria Gram-negativa), *Staphylococcus aureus* (bactéria Gram-positiva) e *Candida albicans* (levedura) confirmam que o *uptake* de PS é dependente da concentração de células em suspensão. Em *S. aureus* tratado com 0,75 μM de pL-ce6 (conjugado de poli-L-lisina com Clorina e6), a quantidade de PS adsorvido variou na razão inversa da concentração em células. Numa suspensão com 10^9 células.mL⁻¹, o valor de PS adsorvido foi $14,8 \times 10^6 \pm 1,58 \times 10^6$ moléculas por célula. Com uma concentração de células aproximadamente 100 vezes menor, o *uptake* aumentou para $3560 \times 10^6 \pm 220 \times 10^6$ moléculas por célula (90).

4.2.3. Efeito da temperatura de incubação

Para avaliar o efeito da temperatura durante o período de incubação no escuro, um terceiro *stock* (C), também congelado durante 57 dias, foi sujeito a um ensaio de *uptake* idêntico ao aplicado aos *stocks* A e B (secção 4.2.1), mas em que a temperatura de incubação no escuro, na presença de 5 μM de PS, foi elevada para 50 °C. Os resultados encontram-se representados na Figura 13. O tratamento a 50 °C resultou numa maior adsorção de PS ($26,3 \times 10^5 \pm 7,38 \times 10^5$ moléculas de PS.UFC⁻¹) no *stock* C, sendo as diferenças estatisticamente significativas relativamente aos resultados obtidos a 37 °C nos *stocks* A (ANOVA, $p=1,13 \times 10^{-3}$) e B (ANOVA, $p=5,36 \times 10^{-4}$).

O efeito da temperatura no *uptake* pode estar relacionado com o aumento da permeabilidade do endósporo ao PS. Ensaio com endósporos de *B. thuringiensis* tratados com uma combinação de temperatura elevada (70-130 °C) e com cloro gasoso revelaram que não houve inativação com temperatura entre 70 e 110°C, mas que a partir de 115 °C, a percentagem de inativação dos endósporos aumentou, atingindo-se a inativação total a 130 °C. Estes resultados foram interpretados como demonstrando um efeito facilitador da temperatura sobre a penetração do cloro gasoso no endósporo (91). O próprio método de coloração usado, de Wirtz-Conklin, utiliza o calor para facilitar a entrada do corante verde de malaquite no endósporo.

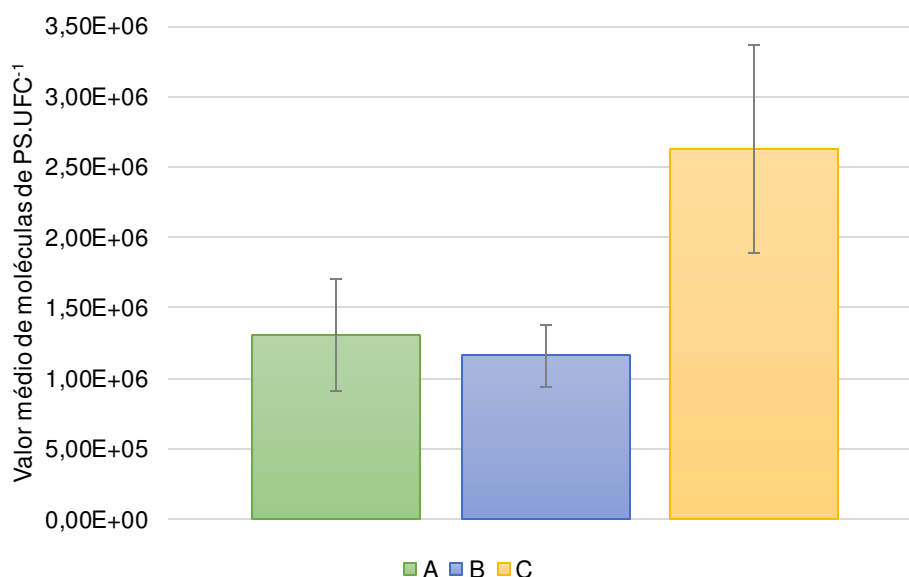


Figura 13: Valores médios de *uptake* de PS com diferentes temperaturas de pré-incubação no escuro: os *stocks* A e B foram pré-incubados à temperatura de 37 °C, e o *stock* C foi pré-incubado a 50 °C. As barras de erro representam o desvio padrão calculado para um conjunto de 5 réplicas.

4.2.4. Efeito da aplicação de alta pressão

Uma vez que as diferenças entre os resultados obtidos nos vários ensaios a 5 µM e 20 µM de PS se revelaram estatisticamente significativas, invalidando o cálculo de valores médios para o conjunto de ensaios, a comparação entre tratamentos para avaliação do efeito da pressão foi feita individualmente para cada ensaio.

A adsorção de PS, na concentração de 5 µM, foi 1,3 – 1,9 vezes mais elevada nos tratamentos com pressão, relativamente aos tratamentos à pressão atmosférica, sendo as diferenças estatisticamente significativas em todos os ensaios, com exceção do ensaio 1 (Tabela 2). Quando a concentração inicial de PS foi elevada para 20 µM, a adsorção foi 2,3 – 76,1 vezes maior nas amostras tratadas com alta pressão (Tabela 3). O aumento da concentração de PS melhorou a fixação de PS em condições de alta pressão, quando comparado com o respetivo controlo à pressão atmosférica. Estes resultados colocam em evidência o potencial da aplicação de alta pressão como um elemento facilitador da adsorção do PS. A

pressão induz a abertura de canais de libertação de ácido dipicolínico, que, por sua vez, levam à germinação do endósporo (61). Estes canais poderão aumentar a área superficial do endósporo, o que aumenta a possibilidade de adsorção do PS. Ensaio de inativação de endósporos e células vegetativas de *C. sporogenes* e *C. beijerinckii* com diferentes combinações de pressão, temperatura e agentes microbianos revelaram que a adição de nisina aumentou a eficiência do tratamento com alta pressão. Os resultados foram interpretados como evidência do efeito facilitador da pressão sobre a penetração de nisina nos endósporos (92).

A ultraestrutura do endósporo de *B. cereus* revela uma dupla camada no exospório, que poderá estar relacionada com uma maior facilidade de adsorção do PS a endósporos desta espécie (3). Em *B. cereus*, a superfície externa do endósporo, o exospório, é composta por duas camadas principais: uma camada mais externa, constituída por uma rede de projeções, semelhantes a vilosidades, e uma camada interna, com um padrão superficial de orifícios hexagonais (93). A camada mais externa pode ser a chave para a adsorção de PS, visto que a estrutura em forma de vilosidades aumenta a área de superfície do endósporo, mas também pode permitir que uma molécula de PS adsorvida, não se desligue tão facilmente. A alta pressão, por seu lado, poderá intensificar a ligação do PS ao exospório, onde ficará preso às estruturas em vilosidade, aumentando o sucesso do *uptake*.

4.3. Efeito da exposição a alta pressão na eficiência de inativação fotodinâmica

De forma a determinar a influência do tratamento de pressão sobre a inativação fotodinâmica, foram realizados 5 ensaios de inativação fotodinâmica com luz branca (1690 W.m^{-2}). Nos 2 primeiros ensaios independentes usou-se 5 μM de PS e 5 min de irradiação. No terceiro ensaio, o tempo de irradiação foi prolongado para 15 min e a concentração testada foi de 20 μM de PS. Os últimos 2 ensaios foram realizados com uma concentração de PS de 20 μM e o tempo de exposição à luz branca foi 60 minutos, numa tentativa de aumentar a eficiência de inativação. As suspensões-*stock* de endósporos usadas tinham uma concentração

inicial de endósporos de $5,47 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹, com um teor vestigial de células vegetativas de 3,1%.

Os resultados dos 5 ensaios de inativação realizados encontram-se resumidos na Figura 14. Os fatores de inativação de IF nos 5 ensaios foram muito baixos (0,2 log de valor máximo), o que indica que, quando o PS foi aplicado à pressão atmosférica, não houve inativação fotodinâmica significativa de endósporos. Estes resultados confirmam a baixa suscetibilidade dos endósporos bacterianos à inativação fotodinâmica.

O fator de inativação mais elevado calculado para cada ensaio, correspondeu ao tratamento IFHP, em que a inativação fotodinâmica foi testada após aplicação de pressão no período de adsorção do PS. Os fatores de inativação registados neste tratamento, com 5 µM de PS e 5 min de irradiação, correspondem a uma redução de 1,4 – 1,8 log. Com 20 µM de PS e 15 min de irradiação, o fator de inativação foi 2,4 log, mas estatisticamente semelhante aos fatores obtidos com 5 µM (ANOVA, $p = 0,616$). Quando o tempo de exposição foi alargado para 60 min, com 20 µM de PS, o fator de inativação variou entre 1,1 e 1,4, resultados estatisticamente semelhantes entre si (ANOVA, $p = 0,759$), e aos obtidos no 3º ensaio (ANOVA, $p = 0,398$).

Em cada ensaio, a diferença entre os fatores de inativação calculados para os tratamentos IF e IFHP foi estatisticamente significativa (ANOVA $p < 2,49 \times 10^{-3}$), o que confirma que a aplicação de alta pressão durante o período de adsorção do PS no escuro aumentou a eficiência de fotossensibilização, por aumento na fixação do PS. Os fatores de inativação obtidos neste trabalho para o tratamento IFHP, são comparáveis com os obtidos em trabalhos anteriores com endósporos de *B. cereus* e com 5 µM de Tetra-Py⁺-Me (89). O fator de inativação descrito para uma suspensão com 10^8 UFC.mL⁻¹, pré-incubada com PS durante 3 h a 37 °C, foi de 1,9 log (89), o que é semelhante aos fatores de inativação obtidos para uma concentração 10 vezes superior de endósporos e a mesma concentração de PS, apenas com 30 minutos de pré-incubação a 37 °C, e um ciclo de pressurização de 30 min, a 300 MPa.

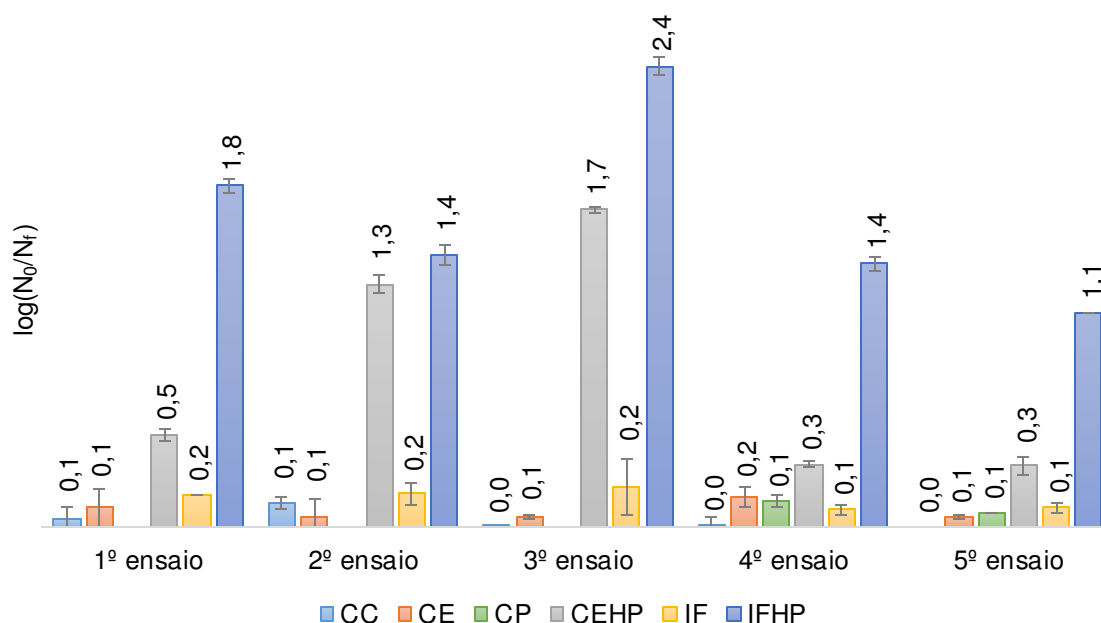


Figura 14: Representação gráfica dos valores médios de fatores de inativação obtidos nos ensaios de PDT. Cálculo baseado na fórmula $FI = \log(N_0/N_t)$, em que N_0 representa a concentração inicial da suspensão diluída com PBS, em $UFC.mL^{-1}$, e N_t , a concentração da suspensão no final de cada controlo/tratamento. Condições testadas: 1º e 2º ensaios - 5 μM , 5 min; 3º ensaio - 20 μM , 15 min; 4º e 5º ensaios - 20 μM , 60 min.

Os fatores de inativação nos controlos CC e CE foram $\leq 0,2$ log, indicando que não houve inativação direta pela luz nem toxicidade direta do PS no escuro, quando aplicado à pressão atmosférica. Os fatores de inativação obtidos para CP, $\leq 0,1$ log, foram semelhantes nos vários ensaios, confirmando que a pressão aplicada (300 MPa) não inativou significativamente endósporos de *B. cereus*. Este controlo não foi incluído nos primeiros 3 ensaios, uma vez que se assumiu à partida que a pressão aplicada não afetaria só por si a viabilidade dos endósporos. No entanto, observou-se inativação no controlo escuro com pressão (CEHP), pelo que, nos 2 ensaios subsequentes, foi incluído um controlo (CP) do efeito direto da alta pressão sobre a viabilidade dos endósporos. Não houve inativação significativa no controlo CP, pelo que a inativação observada nos controlos CEHP pode indicar que o efeito tóxico do PS, negligenciável à pressão atmosférica, é aumentado por exposição à alta pressão.

4.4. Efeito da pressão na citotoxicidade do fotossensibilizador

A hipótese da toxicidade do PS, em diferentes concentrações, bem como do solvente usado para preparar as soluções de PS, foi testada num conjunto de experiências cujos resultados se encontram representados na Figura 15.

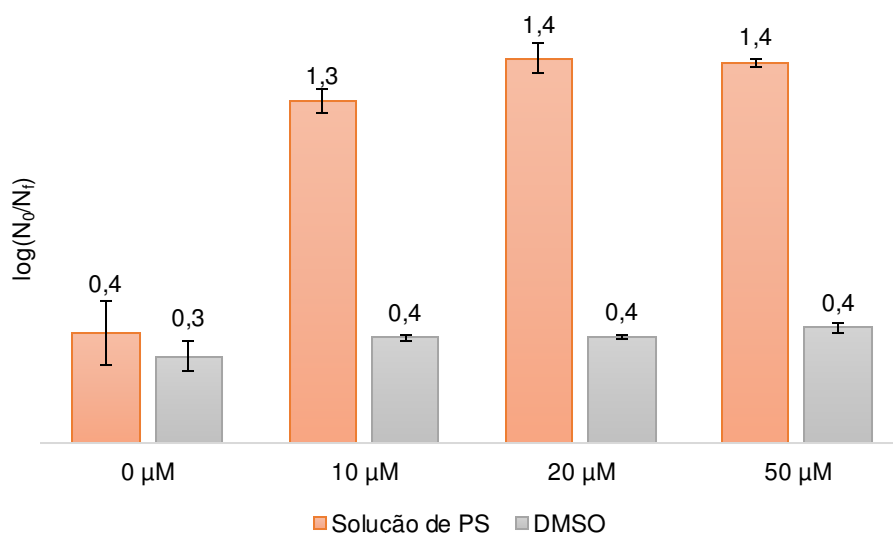


Figura 15: Representação dos valores médios de fatores de inativação obtidos nos ensaios de citotoxicidade do PS e do solvente (DMSO). Cálculo baseado na fórmula $FI = \log(N_0/N_t)$, em que N_0 representa a concentração de endósporos na suspensão inicial, em UFC.mL^{-1} , e N_t , a concentração de endósporos depois do tratamento de pressão, em UFC.mL^{-1} . Volume de solução de PS e volume de DMSO usado em cada ensaio: 0 μM, 0 μL; 10 μM, 30,7 μL; 20 μM, 62,5 μL; 50 μM, 165 μL.

Os fatores de inativação obtidos nos tratamentos a 300 MPa com 10, 20 e 50 μM de PS e com concentrações equivalentes de solvente (DMSO) foram de 1,3-1,4 log. Na ausência de PS, a suspensão pressurizada foi inativada em 0,4 log. À semelhança da suspensão pressurizada sem PS (0 μM), a inativação com DMSO foi 0,3 – 0,4 log para todas as condições testadas.

Os resultados indicam que a citotoxicidade no escuro após exposição à alta pressão está relacionada com o próprio fotossensibilizador e não com o solvente. A presença desta molécula, em qualquer das concentrações testadas, provocou diferenças de 0,9 – 1,0 log na concentração de endósporos viáveis, relativamente ao tratamento de pressão na ausência de PS (0 μM).

5. Conclusões

Os resultados deste trabalho suportam a hipótese de que a aplicação de pressão durante o período de exposição de endósporos bacterianos ao fotossensibilizador melhora a adsorção e, conseqüentemente, aumenta a sua suscetibilidade à inativação fotodinâmica.

Após um período de otimização, foi possível estabelecer um protocolo de obtenção de suspensões-*stock* de endósporos com concentração adequada ($5,47 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹) e com uma proporção vestigial de células vegetativas (3,1%) a partir de culturas de esporulação em meio sólido.

Confirmou-se que a ligação de PS aos endósporos bem como a sua suscetibilidade à inativação fotodinâmica foi superior quando as suspensões foram expostas à pressão 300 MPa durante 30 min, no escuro, o que está provavelmente relacionado com um aumento da permeabilidade do revestimento do endósporo. À pressão atmosférica, a fixação de PS foi também melhorada por aumento da temperatura durante o período de incubação no escuro, o que indica que temperatura e pressão podem ter efeitos análogos na permeabilidade dos endósporos. Há no entanto, indícios de que a aplicação de pressão exacerba a citotoxicidade do PS.

Os fatores de inativação fotodinâmica obtidos neste trabalho são relativamente baixos mas comparáveis aos obtidos em estudos anteriores, para tempos de exposição ao PS superiores (3 h). Pode concluir-se que a aplicação da alta pressão permite reduzir o tempo de pré-incubação com PS, de 3 h a 37 °C para 30 min a 37 °C, à pressão atmosférica, seguida de 30 min a 300 MPa, à temperatura ambiente. Fica assim demonstrado o potencial coadjuvante da alta pressão na inativação fotodinâmica de endósporos.

Considerando que a tecnologia de alta pressão tem já grande aplicação na indústria alimentar, a avaliação da aplicabilidade desta abordagem ao processamento de alimentos deve passar pelo teste de novos fotossensibilizadores não tóxicos, como é o caso de alguns aditivos alimentares já usados com sucesso na inativação fotodinâmica de bactérias na forma vegetativa.

6. Referências

1. Jones, S. Bacterial physiology: New alarm call for spores. *Nature Reviews Microbiology*. 2009;7(1):7.
2. Demidova, T. N. e Hamblin, M. R. Photodynamic inactivation of *Bacillus* spores, mediated by phenothiazinium dyes. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71(11):6918-6925.
3. Oliveira, A. Inativação de endósporos bacterianos com fotossensibilizadores porfirínicos [Tese de Mestrado]. Aveiro, Portugal: Universidade de Aveiro; 2008.
4. Vaz, M. J. S. The antimicrobial effect of wine on *Bacillus cereus* in simulated gastro-intestinal conditions [Tese de Mestrado]. Porto, Portugal: Universidade Católica Portuguesa; 2010.
5. Zhang, Z., Jiang, B., Liao, X., Yi, J., Hu, X. e Zhang, Y. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by combining high-pressure thermal sterilization and ethanol. *International Journal of Food Microbiology*. 2012;160(2):99-104.
6. Setlow, P. I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends in Microbiology*. 2007;15(4):172-180.
7. Cowan, A. E., Olivastro, E. M., Koppel, D. E., Loshon, C. A., Setlow, B. e Setlow, P. Lipids in the inner membrane of dormant spores of *Bacillus* species are largely immobile. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(20):7733-7738.
8. Tocheva, E. I., Matson, E. G., Morris, D. M., Moussavi, F., Leadbetter, J. R. e Jensen, G. J. Peptidoglycan remodeling and conversion of an inner membrane into an outer membrane during sporulation. *Cell*. 2011;146(5):799-812.
9. Broder, D. H. e Pogliano, K. Forespore engulfment mediated by a ratchet-like mechanism. *Cell*. 2006;126(5):917-928.
10. Henriques, A. O. e Moran, C. P. Structure, assembly, and function of the spore surface layers. *Annual Review of Microbiology*. 2007;61:555-588.
11. Setlow, P. Germination of Spores of *Bacillus Subtilis* by High Pressure. *High Pressure Processing of Foods*. Oxford, Inglaterra: Blackwell Publishing; 2007. p. 18.

12. Driks, A. The *Bacillus anthracis* spore. *Molecular Aspects of Medicine*. 2009;30(6):368-373.
13. de Vries, Y. P. *Bacillus cereus* spore formation, structure, and germination [Tese de Doutorado]. Wageningen, Netherlands: Wageningen University; 2006.
14. Errington, J. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*. 2003;1(2):117-126.
15. Reineke, K., Ellinger, N., Berger, D., Baier, D., Mathys, A., Setlow, P. e Knorr, D. Structural analysis of high pressure treated *Bacillus subtilis* spores. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2013;17:43-53.
16. Drobniewski, F. A. *Bacillus cereus* and related species. *Clinical Microbiology Reviews*. 1993;6(4):324-338.
17. Smith, L. A. Botulism and vaccines for its prevention. *Vaccine*. 2009;27 Supplement 4:D33-39.
18. Karalewitz, A. P. e Barbieri, J. T. Vaccines against botulism. *Current Opinion in Microbiology*. 2012;15(3):317-324.
19. Souayah, N., Mehیار, L. S., Khan, H. M., Yacoub, H. A., Abed Al-Kariem, A. A.-Q. Z., Nasar, A., Sheikh, Z. B., Maybodi, L. e Qureshi, A. I. Trends in outcome and hospitalization charges of adult patients admitted with botulism in the United States. *Neuroepidemiology*. 2012;38(4):233-236.
20. Lindstrom, M., Kiviniemi, K. e Korkeala, H. Hazard and control of group II (non-proteolytic) *Clostridium botulinum* in modern food processing. *International Journal of Food Microbiology*. 2006;108(1):92-104.
21. Kopera, D. Botulinum toxin historical aspects: from food poisoning to pharmaceutical. *International Journal of Dermatology*. 2011;50(8):976-980.
22. Aronoff, D. M. *Clostridium novyi*, *sordellii*, and *tetani*: mechanisms of disease. *Anaerobe*. 2013;24:98-101.
23. Fratelli, F., Siquini, T. J., de Abreu, M. E., Higashi, H. G., Converti, A. e de Carvalho, J. C. Fed-batch production of tetanus toxin by *Clostridium tetani*. *Biotechnology Progress*. 2010;26(1):88-92.

24. Friedlander, A. M. Anthrax: clinical features, pathogenesis, and potential biological warfare threat. *Current Clinical Topics in Infectious Diseases*. 2000;20:335-349.
25. Saúde, O. M. d. Tetanus: Organização Mundial de Saúde; 2014 [atualizado em 10 Setembro 2014; citado em 21 Dezembro 2014]. Disponível em: http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/passive/tetanus/en/#.
26. Prevention, C. f. D. C. a. National Botulism Surveillance 2014 [citado em 21 Dezembro 2014]. Disponível em: http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/PDFs/Botulism_CSTE_2012.pdf.
27. Pinto, C. S., Rosa, M. V., Nascimento, M. d. L. P. R. d. e Bordalo, A. Doenças de Declaração Obrigatória 2009-2012. Lisboa: Direção-Geral da Saúde 2013.
28. Fritze, D. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: The aerobic endospore-forming bacteria. *Phytopathology*. 2004;94(11):1245-1248.
29. Zwick, M. E., Joseph, S. J., Didelot, X., Chen, P. E., Bishop-Lilly, K. A., Stewart, A. C., Willner, K., Nolan, N., Lentz, S., Thomason, M. K., Sozhamannan, S., Mateczun, A. J., Du, L. e Read, T. D. Genomic characterization of the *Bacillus cereus sensu lato* species: Backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*. *Genome Research*. 2012;22(8):1512-1524.
30. Rasko, D. A., Altherr, M. R., Han, C. S. e Ravel, J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *Fems Microbiology Reviews*. 2005;29(2):303-329.
31. Koehler, T. M. *Bacillus anthracis* physiology and genetics. *Molecular Aspects of Medicine*. 2009;30(6):386-396.
32. Kuwana, R., Imamura, D., Takamatsu, H. e Watabe, K. Discrimination of the *Bacillus cereus* group members by pattern analysis of random amplified polymorphic DNA-PCR. *Biocontrol Science*. 2012;17(2):83-86.
33. Dybwad, M., van der Laaken, A. L., Blatny, J. M. e Paauw, A. Rapid identification of *Bacillus anthracis* spores in suspicious powder samples by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Applied and Environmental Microbiology*. 2013;79(17):5372-5383.

34. Sinclair, R., Boone, S. A., Greenberg, D., Keim, P. e Gerba, C. P. Persistence of category A select agents in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008;74(3):555-563.
35. Park, H. C., Gedi, V., Cho, J. H., Hyun, J. W., Lee, K. J., Kang, J., So, B. e Yoon, M. Y. Characterization and *in Vitro* inhibition studies of *Bacillus anthracis* FtsZ: a potential antibacterial target. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2014;172(6):3263-3270.
36. Bellan, S. E., Turnbull, P. C. B., Beyer, W. e Getz, W. M. Effects of experimental exclusion of scavengers from carcasses of Anthrax-infected herbivores on *Bacillus anthracis* sporulation, survival, and distribution. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013;79(12):3756-3761.
37. Brossier, F. e Mock, M. Toxins of *Bacillus anthracis*. *Toxicon*. 2001;39(11):1747-1755.
38. Kim, N. Y., Kang, C. I., Hur, G. H., Yang, J. M. e Shin, S. *Bacillus anthracis* lethal toxin induces cell-type-specific cytotoxicity in human lung cell lines. *Journal of Applied Microbiology*. 2014;116(5):1334-1343.
39. Singh, Y., Leppla, S. H., Bhatnagar, R. e Friedlander, A. M. Internalization and processing of *Bacillus anthracis* lethal toxin by toxin-sensitive and toxin-resistant cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1989;264(19):11099-11102.
40. Prince, A. S. The host response to anthrax lethal toxin: unexpected observations. *Journal of Clinical Investigation*. 2003;112(5):656-658.
41. da Silva, R. N., Tomé, A. C., Tomé, J. P. C., Neves, M. G. P. M. S., Faustino, M. A. F., Cavaleiro, J. A. S., Oliveira, A., Almeida, A. e Cunha, A. Photo-inactivation of *Bacillus* endospores: inter-specific variability of inactivation efficiency. *Microbiology and Immunology*. 2012;56(10):692-699.
42. Wig, A., Arakawa, E. T., Passian, A., Ferrell, T. L. e Thundat, T. Photothermal spectroscopy of *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* with microcantilevers. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2006;114(1):206-211.
43. Chen, M. L. e Tsen, H. Y. Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and gyrB gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. *Journal of Applied Microbiology*. 2002;92(5):912-919.

44. Daffonchio, D., Cherif, A. e Borin, S. Homoduplex and heteroduplex polymorphisms of the amplified ribosomal 16S-23S internal transcribed spacers describe genetic relationships in the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000;66(12):5460-5468.
45. Fouet, A. The surface of *Bacillus anthracis*. *Molecular Aspects of Medicine*. 2009;30(6):374-385.
46. Blatchley, E. R., Meeusen, A., Aronson, A. I. e Brewster, L. Inactivation of *Bacillus* spores by ultraviolet or gamma radiation. *Journal of Environmental Engineering*. 2005;131(9):1245-1252.
47. Helgason, E., Okstad, O. A., Caugant, D. A., Johansen, H. A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I. e Kolsto, A. B. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* - one species on the basis of genetic evidence. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000;66(6):2627-2630.
48. Maclean, M., Murdoch, L. E., MacGregor, S. J. e Anderson, J. G. Sporicidal effects of high-intensity 405 nm visible light on endospore-forming bacteria. *Photochemistry and Photobiology*. 2013;89(1):120-126.
49. Maisch, T., Spannberger, F., Regensburger, J., Felgentrager, A. e Baumler, W. Fast and effective: intense pulse light photodynamic inactivation of bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2012;39(7):1013-1021.
50. St Denis, T. G., Dai, T. H. e Hamblin, M. R. Killing bacterial spores with blue light: when innate resistance meets the power of light. *Photochemistry and Photobiology*. 2013;89(1):2-4.
51. Gordon, G. e Rosenblatt, A. A. Chlorine dioxide: The current state of the art. *Ozone: Science and Engineering*. 2005;27(3):203-207.
52. Setlow, B., Loshon, C. A., Genest, P. C., Cowan, A. E., Setlow, C. e Setlow, P. Mechanisms of killing spores of *Bacillus subtilis* by acid, alkali and ethanol. *Journal of Applied Microbiology*. 2002;92(2):362-375.
53. Banerjee, I., Mehta, K. K., Dordick, J. S. e Kane, R. S. Light-activated porphyrin-based formulations to inactivate bacterial spores. *Journal of Applied Microbiology*. 2012;113(6):1461-1467.

54. Nicholson, W. L., Setlow, B. e Setlow, P. Ultraviolet irradiation of DNA complexed with Alpha/Beta-type small, acid-soluble proteins from spores of *Bacillus* or *Clostridium* species makes spore photoproduct but not thymine dimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(19):8288-8292.
55. Schuch, R., Nelson, D. e Fischetti, V. A. A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature*. 2002;418(6900):884-889.
56. Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S. M. S., Balasubramaniam, V. M., Niranjan, K. e Knorr, D. Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2007;47(1):69-112.
57. Lund, B., Baird-Parker, T. C. e Gould, G. W. *Microbiological Safety and Quality of Food*: Springer; 2000.
58. Nakayama, A., Yano, Y., Kobayashi, S., Ishikawa, M. e Sakai, K. Comparison of pressure resistances of spores of six *Bacillus* strains with their heat resistances. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996;62(10):3897-3900.
59. Gola, S., Foman, C., Carpi, G., Maggi, A., Cassara, A. e Rovere, P. Inactivation of bacterial spores in phosphate buffer and in vegetable cream treated with high pressures. *High Pressure Bioscience and Biotechnology*. 1996;13:253-259.
60. Paidhungat, M., Setlow, B., Daniels, W. B., Hoover, D., Papafragkou, E. e Setlow, P. Mechanisms of induction of germination of *Bacillus subtilis* spores by high pressure. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002;68(6):3172-3175.
61. Margosch, D., Ganzle, M. G., Ehrmann, M. A. e Vogel, R. F. Pressure inactivation of *Bacillus* endospores. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004;70(12):7321-7328.
62. Reineke, K., Schlumbach, K., Baier, D., Mathys, A. e Knorr, D. The release of dipicolinic acid - the rate-limiting step of *Bacillus* endospore inactivation during the high pressure thermal sterilization process. *International Journal of Food Microbiology*. 2013;162(1):55-63.

63. Aouadhi, C., Simonin, H., Prevost, H., de Lamballerie, M., Maaroufi, A. e Mejri, S. Inactivation of *Bacillus sporothermodurans* LTIS27 spores by high hydrostatic pressure and moderate heat studied by response surface methodology. *Lwt-Food Science and Technology*. 2013(1):50-56.
64. Margosch, D., Ehrmann, M. A., Ganzle, M. G. e Vogel, R. F. Comparison of pressure and heat resistance of *Clostridium botulinum* and other endospores in mashed carrots. *Journal of Food Protection*. 2004;67(11):2530-2537.
65. Wilson, M. J. e Baker, R. High temperature/ultra-high pressure sterilization of low acid foods. Google Patents; 2000.
66. Gao, Y. L. e Ju, X. R. Exploiting the combined effects of high pressure and moderate heat with nisin on inactivation of *Clostridium botulinum* spores. *Journal of Microbiological Methods*. 2008;72(1):20-28.
67. Mills, G., Earnshaw, R. e Patterson, M. F. Effects of high hydrostatic pressure on *Clostridium sporogenes* spores. *Letters in Applied Microbiology*. 1998;26(3):227-230.
68. Asayama-Kosaka, S., Akilov, O. E. e Kawana, S. Photodynamic therapy with 5% delta-Aminolevulinic acid is safe and effective treatment of Acne Vulgaris in Japanese patients. *Laser Therapy*. 2014;23(2):115-120.
69. Garcez, A. S., Nunez, S. C., Baptista, M. S., Daghashtanli, N. A., Itri, R., Hamblin, M. R. e Ribeiro, M. S. Antimicrobial mechanisms behind photodynamic effect in the presence of hydrogen peroxide. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2011;10(4):483-490.
70. Machado, A. E. D. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova*. 2000;23(2):237-243.
71. Dolmans, D. E., Fukumura, D. e Jain, R. K. Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(5):380-387.
72. Karioti, A. e Bilia, A. R. Hypericins as potential leads for new therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010;11(2):562-594.
73. Taraszkiewicz, A., Fila, G., Grinholc, M. e Nakonieczna, J. Innovative strategies to overcome biofilm resistance. *Biomed Research International*. 2013; 150653 (2013).

74. Wainwright, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1998;42(1):13-28.
75. Alves, E., Faustino, M. A., Neves, M. G., Cunha, A., Tome, J. e Almeida, A. An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. *Future Medicinal Chemistry*. 2014;6(2):141-164.
76. Almeida, A., Cunha, A., Faustino, M. A. F., Tomé, A. C. e Neves, M. G. P. M. S. Chapter 5 Porphyrins as Antimicrobial Photosensitizing Agents. Editores: Hamblin, M. R., Jori, G. e Hader, D. P. *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications*. 11: The Royal Society of Chemistry; 2011. p. 83-160.
77. Korth, C., May, B. C. H., Cohen, F. E. e Prusiner, S. B. Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(17):9836-9841.
78. Jori, G. Photodynamic therapy of microbial infections: State of the art and perspectives. *Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology*. 2006;25(1-2):505-519.
79. Huang, X., Nakanishi, K. e Berova, N. Porphyrins and metalloporphyrins: versatile circular dichroic reporter groups for structural studies. *Chirality*. 2000;12(4):237-255.
80. Minnock, A., Vernon, D. I., Schofield, J., Griffiths, J., Parish, J. H. e Brown, S. B. Mechanism of uptake of a cationic water-soluble pyridinium zinc phthalocyanine across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000;44(3):522-527.
81. Maisch, T., Bosl, C., Szeimies, R. M., Love, B. e Abels, C. Determination of the antibacterial efficacy of a new porphyrin-based photosensitizer against MRSA *ex vivo*. *Photochemical and Photobiological Sciences*. 2007;6(5):545-551.
82. Dutta, S., Waki, K. e Chang, K. P. Combinational sensitization of *Leishmania* with uroporphyrin and aluminum phthalocyanine synergistically enhances their photodynamic inactivation *in vitro* and *in vivo*. *Photochemistry and Photobiology*. 2012;88(3):620-625.

83. Rouhani, H., Sepehri, N., Montazeri, H., Khoshayand, M. R., Ghahremani, M. H., Ostad, S. N., Atyabi, F. e Dinarvand, R. Zinc protoporphyrin polymeric nanoparticles: potent Heme oxygenase inhibitor for cancer therapy. *Pharmaceutical Research*. 2014;31(8):2124-2139.
84. Benz-de Bretagne, I., Zahr, N., Le Gouge, A., Hulot, J. S., Houillier, C., Khe, H. X., Gyan, E., Lissandre, S., Choquet, S. e Le Guellec, C. Urinary coproporphyrin I/(I plus III) ratio as a surrogate for MRP2 or other transporter activities involved in methotrexate clearance. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2014;78(2):329-342.
85. Pereira, M. A., Faustino, M. A. F., Tomé, J. P. C., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Cunha, A. e Almeida, A. Influence of external bacterial structures on the efficiency of photodynamic inactivation by a cationic porphyrin. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2014;13(4):680-690.
86. Hamblin, M. R. e Hasan, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2004;3(5):436-450.
87. Preuss, A., Zeugner, L., Hackbarth, S., Faustino, M. A. F., Neves, M. G. P. M. S., Cavaleiro, J. A. S. e Roeder, B. Photoinactivation of *Escherichia coli* (SURE2) without intracellular uptake of the photosensitizer. *Journal of Applied Microbiology*. 2013;114(1):36-43.
88. Stockel, S., Meisel, S., Bohme, R., Elschner, M., Rosch, P. e Popp, J. Effect of supplementary manganese on the sporulation of *Bacillus* endospores analysed by Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2009;40(11):1469-1477.
89. Oliveira, A., Almeida, A., Carvalho, C. M. B., Tomé, J. P. C., Faustino, M. A. F., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S. e Cunha, A. Porphyrin derivatives as photosensitizers for the inactivation of *Bacillus cereus* endospores. *Journal of Applied Microbiology*. 2009;106(6):1986-1995.
90. Demidova, T. N. e Hamblin, M. R. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005;49(6):2329-2335.

91. Mulamba, O., Hunt, E. M. e Pantoya, M. L. Neutralizing bacterial spores using halogenated energetic reactions. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2013;18(5):918-925.
92. Hofstetter, S., Gebhardt, D., Ho, L. D., Ganzle, M. e McMullen, L. M. Effects of nisin and reutericyclin on resistance of endospores of *Clostridium* spp. to heat and high pressure. *Food Microbiology*. 2013;34(1):46-51.
93. Gerhardt, P. e Ribí, E. Ultrastructure of the exosporium enveloping spores of *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology*. 1964;88:1774-1789.